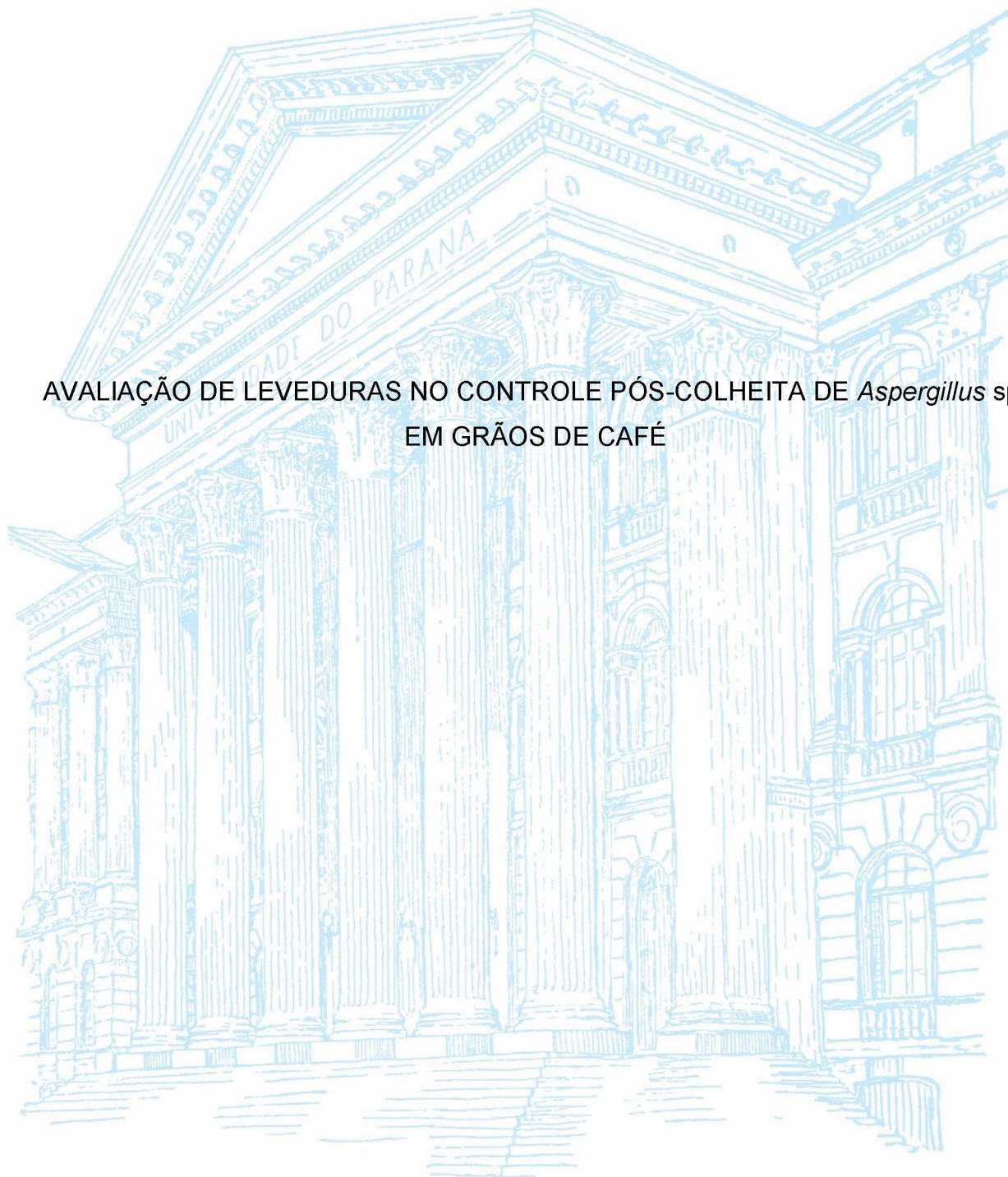


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISABELA PAULUK CORRÊA

AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NO CONTROLE PÓS-COLHEITA DE *Aspergillus* sp.
EM GRÃOS DE CAFÉ



CURITIBA

2019

ISABELA PAULUK CORRÊA

AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NO CONTOLE PÓS-COLHEITA DE *Aspergillus* sp.
EM GRÃOS DE CAFÉ

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Corrêa, Isabela Pauluk

Avaliação de leveduras no controle pós-colheita de *Aspergillus sp.* em
grãos de café. / Isabela Pauluk Corrêa. – Curitiba, 2019.
77 p.: il.

Orientadora: Ida Chapaval Pimentel

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

1. Coffea 2. Leveduras 3. Metabólitos 4. Fungos filamentosos 5.
Controle biológico de vetores 6. Compostos orgânicos voláteis I. Título II.
Pimentel, Ida Chapaval III. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

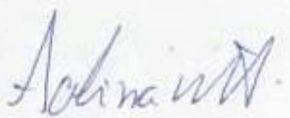
TERMO DE APROVAÇÃO

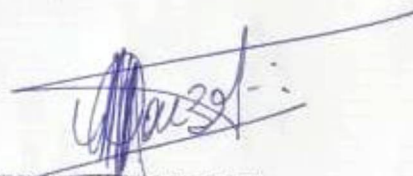
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de ISABELA PAULUK CORREA intitulada: **AVALIAÇÃO DE LEVEDURAS NO CONTROLE PÓS-COLHEITA DE *Aspergillus* sp. EM GRÃOS DE CAFÉ**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


CURITIBA, 28 de Março de 2019.


IDA CHAPAVAL PIMENTEL
Presidente da Banca Examinadora


SABINA MOSER TRALAMAZZA
Avaliador Externo (USP)


WESLEY MAURICIO DE SOUZA
Avaliador Externo (UFPR)


LUCY ONO
Avaliador Externo (UFPR)


BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico este trabalho à minha família que com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Vera e Mauricio. À minha mãe pelo apoio ao ouvir meus relatos diários dos acontecimentos do laboratório, e ao meu pai, pelos conselhos.

Ao meu noivo, Sélem, pela parceria, compreensão e por estar sempre disponível para me ajudar com um sorriso no rosto.

À minha irmã Juliana, meu cunhado Tiago e minha sobrinha maravilhosa Violeta, obrigada pelo companheirismo, amizade, conselhos.

Aos meus pets Capitu (minha eterna companheira) e Mei, que estavam sempre comigo nas diversas horas de escrita.

Agradeço também aos amigos do LabMicro, a todos os colegas que passaram nesses 6 anos, por deixarem o dia a dia muito mais divertido.

À minha orientadora professora Ida, pelas contribuições, sugestões, acompanhamento e alguns puxões de orelha.

Ao programa de Pós-Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender”

Marie Curie

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida pelos fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, normalmente encontrada em cereais, trigo, uva e café. A OTA é nefrotóxica, neurotóxica, imunossupressora e considerada uma possível causadora de câncer em humanos. No Brasil, os principais produtores de OTA são: *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*. O uso de leveduras no controle do crescimento de fungos filamentosos é considerado uma alternativa ao uso de produtos químicos, pois estas não produzem micotoxinas e tem a capacidade de crescer em condições extremas de pH e atividade água. Além disso, não são microrganismos fastidiosos e crescem em superfícies secas por longos períodos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial inibitório de leveduras e dos compostos produzidos por elas frente a fungos do gênero *Aspergillus* produtores de OTA. A seleção das leveduras com potencial inibitório foi realizada *in vitro*, em testes de cultura pareada e avaliando a produção de compostos voláteis e metabólitos. Os testes em grão de café foram conduzidos pela pulverização da levedura em grãos de café contaminados com fungos do gênero *Aspergillus*. Por fim, foram preparados extratos das leveduras, e o que apresentou maior atividade inibitória teve seus metabólitos extraídos e identificada a substância capaz de inibir o crescimento de *A. ochraceus* e *A. carbonarius*. A levedura *Wickerhamomyces anomalus* mostrou os melhores resultados frente aos fungos filamentosos utilizados. A levedura inibiu em até 100% o fungo *A. ochraceus in vitro* e em 40% o fungo nos grãos de café. O fungo *A. carbonarius* nos grãos de café foi inibido pela levedura *W. anomalus* na maior concentração utilizada (1×10^7 células/mL). Os metabólitos produzidos pela levedura *Hyphopichia burtonii* inibiram o crescimento de *A. ochraceus* e *A. carbonarius in vitro*. Fracionando e identificando os componentes do metabólito, observou-se que a substância feniletanol foi indicada como sendo responsável por tais inibições. Os resultados obtidos são promissores, mostrando que a bioprospecção de leveduras isoladas de grãos de café pode ser uma alternativa no controle de fungos produtores de OTA.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. *Wickerhamomyces anomalus*. *Hyphopichia burtonii*. Compostos voláteis. Metabólitos. Biocontrole.

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by fungi of the genus *Aspergillus* and *Penicillium*, normally found in cereals, wheat, grapes and coffee. OTA is nephrotoxic, neurotoxic, immunosuppressive and a possible cause of cancer in humans. In Brazil, the main OTA producers are *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius*. The use of yeasts in the growth control of filamentous fungi is an alternative to the use of chemical products, since these are not mycotoxins producers and they grow in environments with extreme pH and water activity range. In addition, they are not fastidious microorganisms and grow on dry surfaces for long periods. Thus, the objective of this work was to evaluate the inhibitory potential of yeasts and the compounds produced by them against fungi of the genus *Aspergillus* OTA-producers. The selection of yeasts with inhibitory potential was performed *in vitro*, in paired culture tests and evaluated the production of volatile compounds. Tests were conducted in coffee beans by spraying the yeast in green coffee beans contaminated with *Aspergillus* sp. Finally, yeast extracts was prepared, and the one that presented greater inhibitory activity had its metabolites extracted and identified the substance capable of inhibiting the growth of *A. ochraceus* and *A. carbonarius*. The yeast *Wickerhamomyces anomalus* showed the best inhibitory effect *in vitro* against the filamentous fungi used. The yeast totally inhibited the fungus *A. ochraceus* *in vitro* and in 40% the fungus in coffee beans. The fungus *A. carbonarius* was inhibit in coffee beans by *W. anomalus* at the concentration of 1×10^7 cells/mL. The metabolites of yeast *Hyphopichia burtonii* inhibited the growth of *A. ochraceus* and *A. carbonarius*. By fractionating and identifying the components of the metabolite, it was observed that the substance Phenylethanol was indicated as being responsible for such inhibitions. The results obtained are promising, showing that the bioprospecting of yeasts isolated from coffee beans may be an alternative in the control of OTA-producing fungi.

Keywords: *Coffea arabica*. *Wickerhamomyces anomalus*. *Hyphopichia burtonii*.

Volatile compounds. Metabolites. Biocontrol.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Redução da produção de OTA em <i>A. ochraceus</i> e <i>A. carbonarius</i> por leveduras isoladas e grãos de café.....	Erro! Indicador não definido.
GRÁFICO 2 - Porcentagens de inibição de <i>A. ochraceus</i> (A) e <i>A. carbonarius</i> (B) nos meios de cultura SB, CA e CZA.....	37
GRÁFICO 3 - Porcentagens de inibição de <i>A. ochraceus</i> (A) e <i>A. carbonarius</i> (B) por compostos voláteis produzidos por leveduras isolada de grãos de café	39
GRÁFICO 4 - Porcentagem de infecção de <i>A. carbonarius</i> (A) e <i>A. ochraceus</i> (B) em grãos de café inoculados com <i>W. anomalus</i>	42
GRÁFICO 5 - Porcentagens de inibição de <i>A. ochraceus</i> e <i>A. carbonarius</i> por extratos de leveduras isoladas de grãos de café	54
GRÁFICO 6 - Porcentagem de inibição de <i>A. ochraceus</i> e <i>A. carbonarius</i> por metabólitos de <i>H. burtonii</i>	56
GRÁFICO 7 - Viabilidade celular das linhagens HPEG2, HRT18, HeLa e McCoy contra extrato de <i>H. burtonii</i>	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Leveduras isoladas de grãos de café	32
TABELA 2 - Leveduras isoladas de grãos de café	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Desenho experimental do teste de inibição de espécies de <i>Aspergillus</i> em grãos de café.....	35
FIGURA 2 - Teste de inibição de leveduras isoladas de grãos de café frente a <i>A. ochraceus</i> em meio Sabouraud.....	36
FIGURA 3 - Análise do potencial inibitório de <i>W. anomalus</i> frente ao fungo <i>A. ochraceus</i>	40

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I – Cromatogramas.....	74
------------------------------	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 CONTROLE BIOLÓGICO POR LEVEDURAS.....	15
3.2 CONTROLE BIOLÓGICO EM ALIMENTOS.....	16
3.3 MECANISMOS DE AÇÃO.....	19
3.3.1 Compostos voláteis.....	19
3.3.2 Degradação de toxinas.....	20
3.3.3 Toxina <i>killer</i>	20
3.3.4 Competição por nutrientes.....	21
3.3.5 Metabólitos secundários.....	22
3.4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2 – BIOCONTROLE DE LEVEDURAS EM GRÃOS DE CAFÉ VERDE CONTRA ESPÉCIES DE <i>Aspergillus</i> PRODUTORAS DE OCRATOXINA A.....	29
RESUMO.....	30
1 INTRODUÇÃO.....	30
2 MATERIAL E MÉTODO.....	31
2.1 CULTURAS.....	31
2.2 MEIOS DE CULTURA.....	33
2.3 EFEITO INIBITÓRIO DE LEVEDURAS NOS MEIOS SB, CZA E CA.....	33
2.4 EFEITO INIBITÓRIO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR LEVEDURAS.....	34
2.5 ANÁLISE DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE LEVEDURAS SELECIONADAS EM GRÃOS DE CAFÉ VERDE CONTRA <i>Aspergillus</i> sp.....	34
2.5.1 Preparo do inóculo.....	34
2.5.2 Preparo dos grãos de café.....	35
2.5.3 Inoculação em grãos de café.....	35

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.1 EFEITO INIBITÓRIO DE LEVEDURAS NOS MEIOS SB, CZA E CA.....	36
3.2 EFEITO INIBITÓRIO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR LEVEDURAS.....	38
3.3 ANÁLISE DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE LEVEDURAS SELECIONADAS EM GRÃOS DE CAFÉ VERDE CONTRA <i>Aspergillus</i> sp.....	40
4 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
CAPÍTULO 3 – ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>H. burtonii</i> FRENTA A ESPÉCIES DE <i>Aspergillus</i>.....	47
RESUMO.....	48
1 INTRODUÇÃO.....	49
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	50
2.2 FERMENTAÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITO.....	50
2.3 TESTE DE DISCO DIFUSÃO.....	50
2.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO.....	50
2.5 SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DO METABÓLITO.....	51
2.6 IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ANTIFÚNGICA.....	51
2.7 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....	52
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1 TESTE DE DISCO DIFUSÃO.....	53
3.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO.....	54
3.3 SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DO METABÓLITO.....	55
3.4 IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ANTIFÚNGICA.....	56
3.6 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE.....	58
4 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS GERAIS.....	66

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é o segundo produto mais exportado por países em desenvolvimento, sendo o Brasil o maior produtor de café arábica, rico em sabor e óleos aromáticos (ABIC, 2017). Existem duas formas de processamento de café, a via seca, onde não é retirada a casca e a mucilagem da cereja (café maduro), sendo o café secado diretamente ao sol, em terreiros, e via úmida, onde são retiradas a casca e a mucilagem da cereja com o auxílio de água e em seguida ocorre a secagem. No Brasil, a via seca é mais comumente utilizada. Esta via é empregada principalmente quando a secagem necessita ser rápida, pois uma grande quantidade de material pode ser espalhada no terreiro. Neste processo, diversos fatores são essenciais para a obtenção de um café de boa qualidade, como a espessura do espalhamento, a agitação e o tempo de secagem (ABIC, 2017; VELMOUROUGANE; BHAT; GOPINANDHAN, 2010).

O café, após passar pelo processo de secagem, é armazenado em tulhas geralmente de madeira, onde são reduzidas as variações de temperatura, garantindo a qualidade do café. O produto é preferencialmente armazenado sem passar pelo processo de beneficiamento (retirada das cascas e separação dos grãos, para obtenção do fruto seco, café beneficiado ou café verde), a fim de conservar mais as características do produto. Após o beneficiamento o café é novamente armazenado, podendo ficar em sacos de junta, silos ou tulhas por até 3 anos (EMBRAPA, 2004).

Estudos mostram que a mucilagem do café (camada viscosa, rica em açúcares, situada entre a polpa e o pergaminho) pode ser um bom substrato para diversos microrganismos. Os grãos podem ser contaminados principalmente durante o seu processamento pela via seca, na qual a mucilagem não é retirada (SILVA et al., 2000). Diversos autores isolaram microrganismos de grãos de café, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (COUTO et al., 2014; DE BARROS; JULIATTI, 2012; NAYAK et al., 2013; NGANOU et al., 2012; PEREIRA et al., 2015). Dos fungos filamentosos isolados de grãos de café, encontram-se os fungos do gênero *Aspergillus* (*Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*), os principais produtores de ocratoxina A no Brasil (TANIWAKI et al., 2014).

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* que são agentes de biodeterioração (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). Em locais com clima temperado (temperatura ótima 15-25°C), o *Penicillium verrucosum* é o principal produtor de ocratoxina A,

enquanto que em locais com o clima mais quente (temperatura ótima 25-30°C), existem vários produtores de OTA como *A. carbonarius*, *A. ochraceus* e o *A. westerdijkiae* (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010; MITCHELL et al., 2004; RAMOS et al., 1998).

A OTA é rapidamente absorvida e sua eliminação é renal, ocorrendo acúmulo nos rins e causando danos como na doença conhecida como nefropatia endêmica dos Balcãs, uma doença renal crônica que pode acometer vários órgãos e causar tumores, como de pelve renal e bexiga (DE CERAIN et al., 2002; EFSA, 2006; KHOURY; ATOUI, 2010; PFOHL-LESZKOWICZ, 2009; RIBELIN; FUKUSHIMA; STILL, 1978). A OTA é classificada no grupo 2B da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), ou seja, é um possível causador de câncer em humano (IARC, 1993).

Produtos que podem ser frequentemente contaminados pela OTA são cereais, café, vinho, suco de uva, frutas secas e condimentos (EFSA, 2006; NAEBPOOR; MOMENI; DEHKORDI, 2013; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009). A OTA presente no café está relacionada com más condições de secagem, pós-colheita e armazenagem (DURAND et al., 2013). Uma maneira básica de evitar a contaminação dos alimentos pela OTA é realizar a prevenção da contaminação pré e pós-colheita (BATTACONE; NUDDA; PULINA, 2010; EFSA, 2006).

Uma alternativa para a inibição de fungos produtores de OTA em grãos de café é a utilização do controle biológico realizado por leveduras, pois estas não são patogênicas, não produzem esporos alergênicos ou micotoxinas (DRUVEFORS et al., 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial inibitório de leveduras isoladas em grãos de café e dos compostos produzidos por elas no controle de crescimento de fungos do gênero *Aspergillus*, produtores de ocratoxina A em grãos de café armazenados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar dentre as leveduras isoladas dos grãos de café quais apresentam o melhor potencial inibitório, *in vitro*, frente às linhagens de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*, produtoras de ocratoxina A;
- Analisar a capacidade de compostos voláteis das leveduras na inibição dos fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius*;
- Executar testes de pulverização da levedura selecionada, em grãos de café contaminados com fungos do gênero *Aspergillus*;
- Extrair e testar o metabólito produzido pela levedura selecionada capaz de inibir o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus*;
- Isolar e identificar a fração do metabólito da levedura selecionada capaz de inibir o crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de ocratoxina A.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONTROLE BIOLÓGICO POR LEVEDURAS

Controle biológico é a utilização de microrganismos, predadores e parasitos no controle de pragas e fitopatógenos, sendo um método alternativo e racional à utilização de produtos químicos capaz de reduzir a infecção de frutos e a produção de micotoxinas. Esta técnica utiliza a inserção de inimigos naturais das pragas, sendo inofensiva ao meio ambiente e ao consumidor final, podendo ser utilizada em campo e em pós colheita (EMBRAPA, 2019; FARBO et al., 2018). O controle biológico é utilizado em alternativa ao uso de produtos químicos, que podem gerar ao meio ambiente a contaminação de alimentos, água, animais e solo, redução da biodiversidade, resistência de pragas e fungos e intoxicação, principalmente de agricultores (EMBRAPA, 2019).

Esta técnica se faz necessária frente ao aumento da utilização de agrotóxicos e pesticidas, sendo o Brasil responsável por 12% do consumo mundial deste produto. São consumidos mundialmente 2,5 milhões de toneladas, enquanto que no Brasil utilizam-se 300 mil toneladas. O volume de agrotóxicos utilizados dobrou nos últimos 10 anos, e destes 30% são muito tóxicos, tendo seu uso nos alimentos limitado por

diversos países. Frente a esse cenário, surge a necessidade de novas alternativas que evitem a poluição ambiental e não ponham em risco a saúde da população, preservando a diversidade de microrganismos, melhorando a qualidade dos produtos, e reduzindo a poluição ambiental (EMBRAPA, 2019).

Sendo assim, métodos alternativos como a utilização de leveduras se tornam uma boa opção por conta de suas propriedades, vez que estas crescem com nutrientes simples, em superfícies secas ou com baixa atividade água e baixo nível de oxigênio, podendo crescer rapidamente em uma ampla gama de substratos em biorreatores. Leveduras são isoladas de diversas matrizes alimentares, competem por nutrientes e substratos, produzem metabólitos e degradam toxinas. A maioria delas não é patogênica, não produz esporos alergênicos ou micotoxinas, e já foram amplamente estudadas quanto a suas capacidades inibitórias em alimentos e sua co-inoculação com adjuvantes de alimentos (DRUVEFORS et al., 2002; FARBO, et al., 2018; LIU; TSAO, 2009; NALLY et al., 2015; WANG et al., 2019; ZHU et al., 2015). Com isso, esta revisão tem por objetivo elucidar os mecanismos de ação e utilização destas leveduras na produção de alimentos e bebidas.

3.2 CONTROLE BIOLÓGICO EM ALIMENTOS

Leveduras podem evitar o apodrecimento de uvas causado pelos fungos dos gêneros *Botrytis*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Diversos estudos relatam essa inibição, como o de Parafati et al. (2017), utilizando as leveduras *Metschnikowia pulcherrima*, *Aureobasidium pullulans*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Saccharomyces cerevisiae* na inibição de *Botrytis cinerea* em uvas contaminadas por estes, sendo a levedura *M. pulcherrima* responsável pela maior inibição de mofo cinzento em uvas. Leveduras isoladas de frutos podem protegê-los contra fungos toxigênicos, Zhu et al. (2015) encontraram que leveduras aplicadas em cachos de uvas podem inibir os fungos que contaminam o fruto (*A. ochraceus* e *A. carbonarius*). Destas leveduras, a *S. cerevisiae* mostrou-se altamente eficaz inibindo *in vivo* os fungos utilizados. Wang et al. (2019) utilizaram a levedura *Yarrowia lipolytica*, isolada de uvas, para avaliar sua função em apodrecimento pós colheita causado por *Penicillium rubens*. Aplicando diversas concentrações de levedura, encontraram que um aumento de concentração gerou uma maior inibição e diminuição das lesões causada pelo fungo. Além disso, a levedura foi capaz de reduzir significativamente a produção de OTA pelo fungo nos

frutos, o induzindo a produzir enzimas para a sua defesa e indicando que estas leveduras podem ser utilizadas de forma harmônica, sem a introdução de novos microrganismos no ambiente.

As leveduras conseguem crescer no presunto, competindo assim com seus fungos deteriorantes. Daquelas, a *Debaryomyces* spp. é capaz de colonizar a superfície do presunto, e graças aos compostos voláteis produzidos é possível preservar as suas características sensoriais. Os autores enfatizam que leveduras produzem diversas moléculas que potencializam o perfil aromático de produtos curados de origem animal (SIMONCINI et al., 2015).

Em morangos e tangerinas as leveduras *W. anomalus*, *M. pulcherrima*, *A. pullulans* e *S. cerevisiae* foram capazes de inibir os fungos *B. cinerea*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*. Os compostos voláteis produzidos por *W. anomalus*, imobilizados em esferas de hidrogel, reduziram significativamente o crescimento dos 3 fungos testados de acordo com a incidência de doença, severidade e tamanho da lesão, mostrando que não é necessário o contato direto entre os agentes para gerar uma inibição (PARAFATI et al., 2017).

A produção de toxina killer por *W. anomalus* foi testada por Ullivarri, Mendoza e Raya (2018), sendo a levedura, isolada da fermentação de vinho, utilizada na inibição de demais leveduras que alteram as características sensoriais do produto. A levedura apresentou atividade contra fungos, leveduras e bactérias. Sua toxina é estável no vinho, mostrando a viabilidade de utilizá-la na inibição de leveduras nos processos de fabricação desta bebida, além de quando co-inoculada a *S. cerevisiae* na fermentação, estas produzem níveis moderados de acetato de etila, sendo possível a sua utilização na fermentação alcoólica do vinho.

Leveduras são importantes nas diversas etapas de processamento do café, desde a remoção da mucilagem até o desenvolvimento de aroma característico, gerando um produto com alta qualidade. Velmourougane, Bhat e Gopinandhan (2011), fermentaram grãos de café com *S. cerevisiae* por 24 horas, e neste curto período esta já foi capaz de reduzir a população de espécies de *Aspergillus*, os principais contaminantes de café, além de diminuir a concentração de OTA por este produzida. A concentração de OTA poderia ter sido reduzida por ter sido absorvida pela levedura. Estes experimentos demonstram que esse método, barato e prático, é eficiente na inibição de tais fungos. A levedura utilizada não é tóxica, não causando danos nos grãos e ao consumidor, e avaliadas as características sensoriais dos grãos após a

inoculação, observou-se que mesmo a maior concentração de levedura utilizada não afetou a qualidade da bebida (VELMOUROUGANE; BHAT; GOPINANDHAN, 2011). O controle biológico ainda pode ser realizado pós-colheita, onde foi testada a capacidade da levedura *W. anomalus*, isolada de grãos de café, na inibição de *A. ochraceus* e *A. carbonarius* em grãos de café armazenados (PAULUK-CORRÊA; BOZZA DE ALMEIDA; PIMENTEL, 2018). A levedura *W. anomalus* por ser uma levedura que não produz toxinas nem esporos alergênicos, e por crescer em condições extremas, ela foi utilizada (DRUVEFORS et al., 2002). Grãos de café foram então contaminados com *A. ochraceus* ou *A. carbonarius* e *W. anomalus*, sendo os mesmos armazenados nas condições que mimetizam as existentes no campo. Concluiu-se que a levedura foi capaz de inibir o crescimento de *A. ochraceus*, e apenas na maior concentração utilizada inibiu *A. carbonarius*, sendo, portanto uma forte candidata a ser utilizada no controle biológico (PAULUK-CORRÊA; BOZZA DE ALMEIDA; PIMENTEL, 2018). Pereira et al. (2015) sugerem que frutos de café são uma fonte de microrganismos com potencial de biocontrole, e utilizando a levedura *Pichia fermentans* em grãos de café contaminados com *A. westerdijkiae* encontraram que a mesma foi capaz de reduzir a OTA produzida pelo fungo. Os autores indicam a utilização da levedura em larga escala, pois é possível que a toxina tenha sido absorvida ou degradada pela levedura.

Existem diversos trabalhos que relatam a utilização de leveduras em alimentos, como a inibição de *Penicillium digitatum* em limões e laranjas por *Debaryomyces hansenii* (MEDINA-CÓRDOVA et al., 2018). Tal levedura ainda é capaz de inibir contaminantes em milho, iogurtes e queijos, sendo a inibição causada por competição de espaço/nutrientes ou pela produção de toxinas que inibem a síntese da parede celular (MEDINA-CÓRDOVA et al., 2018; LIU; TSAO, 2009). A co-inoculação de *Pichia caribbica* juntamente com um antioxidante (ácido fítico) aumenta sua capacidade inibitória e a torna mais estável, sendo capaz de inibir o mofo azul (*Penicillium expansum*) em maçãs colhidas (MAHUNU et al., 2016). Os frutos de tangerina utilizados por Habiba et al. (2019) apresentam uma menor perda de massa e amolecimento após o tratamento com *S. cerevisiae* para inibir *P. digitatum* quando comparados aos controles, mostrando que a utilização deste microrganismo não só inibiu o crescimento do fungo como também conservou as características do fruto.

As leveduras podem também ser utilizadas em armazenamentos de longos períodos como uma proteção pós-colheita contra fungos. Por 14 meses Druvefors

et al. (2002) analisaram a capacidade de *P. anomala* em inibir o crescimento de *Penicillium roqueforti* em silos contendo trigo. Apesar das variações de temperatura e aeração, a levedura conseguiu evitar a proliferação do fungo, sendo esta técnica indicada pelos autores como uma alternativa a secagem de cereais. Estes trabalhos indicam que a troca de produtos químicos por biológicos, principalmente leveduras, gera uma ação benéfica, inibindo o microrganismo degradante e conservando a integridade dos alimentos por mais tempo.

3.3 MECANISMO DE AÇÃO

3.3.1 Compostos voláteis

Certas leveduras produzem compostos voláteis, que dentre diversas funções, podem ser utilizadas no controle biológico, sendo possível utilizá-los no controle pós-colheita de fungos produtores de micotoxinas em alimentos, já que eles não deixam resíduos e não é necessário o contato direto entre a levedura e o alimento (PARAFATI et al., 2017; WERNER; POLLE; BRINKMANN, 2016). Os compostos voláteis já se mostraram capazes de inibir o crescimento de *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, além de inibir sua produção de OTA, alterando a expressão de genes responsáveis pela produção desta toxina (FARBO et al., 2018). Já foi estudada a capacidade inibitória destes compostos produzidos pelas leveduras dos gêneros *Wickerhamomyces* sp., *Metschnikowia* sp., *Aureobasidium* sp., *Saccharomyces* sp., *Cyberlindnera* sp., *Candida* sp., *Lachancea* sp., *Pichia* sp., *Hanseniaspora* sp. entre outras (FARBO et al., 2018; MASOUD; POLL; JAKOBSEN, 2005; PARFATI et al., 2017; ZHU et al., 2015).

Os compostos voláteis podem ser identificados como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, compostos sulfúricos, hidrocarbonetos, terpenos, entre outros (FARBO et al., 2018; SIMONCINI et al., 2015). Pesquisadores identificaram o 2-feniletanol como o principal composto volátil produzido pelas leveduras *Cyberlindnera jadinii*, *Candida friedrichii*, *Candida intermedia* e *Lachancea thermotolerans*, responsável por sua toxicidade (FARBO et al., 2018). Compostos voláteis são quimicamente caracterizados como substâncias de baixa polaridade e peso molecular e com alta pressão de vapor, o que possibilita sua evaporação, aumentando a sua dispersão. São diversas as vias metabólicas para a sua produção, justamente pela

diversidade de compostos que são produzidos (WERNER; POLLE; BRINKMANN, 2016).

3.3.2 Degradação de toxinas

Leveduras têm a capacidade de inibir o crescimento de fungos produtores de toxinas, porém, em estudo feito por Zhu et al. (2015), depois da produção de OTA, as leveduras *Metschnikowia aff. fructicola*, *Pichia kluyveri*, *Candida zemplinina* e *S. cerevisiae* não foram capazes de degradar a OTA presente no meio de cultura. Estudos indicam que a redução de OTA secretada pelos fungos pode decorrer da inibição de seu crescimento (MASOUD; POLL; JAKOBSEN, 2005). Outras leveduras, porém, têm a capacidade de absorver a OTA presente no meio, como relatado por Fiori et al. (2014). Este estudo apontou que as leveduras *Candida friedrichii*, *Candida intermedia* e *Lachancea thermotolerans* reduziram em até 75% a concentração de OTA presente em suco de uva contaminado, mostrando a enorme capacidade destas de absorverem toxinas. As células inativadas das leveduras também apresentam esta capacidade. A levedura *Aureobasidium pullulans* tem a capacidade de degradar a OTA, gerando uma hidrólise no seu grupamento amino, transformando-a em ocratoxina α (DE FELICE et al., 2008).

3.3.3 Toxina *killer*

Algumas leveduras têm como mecanismo de defesa a capacidade de produzir toxinas, proteínas antibióticas capazes de inibir outras leveduras. Esta proteína foi descoberta na levedura *S. cerevisiae*, porém diversas outras leveduras a expressam, como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* e *Zygosaccharomyces*. Esta toxina distribui-se em 3 grupos - K1, K2 e K28 - de acordo com suas características, sendo as células leveduriformes jovens as mais susceptíveis aos seus efeitos (MAGLIANI et al., 1997).

Estudos indicam que a toxina *killer* isolada de *W. anomalus* é importante na produção de vinho, sendo estável a 35 °C e resistente a variações de níveis de açúcar, etanol e dióxido de enxofre. Além disso ela controla algumas leveduras presentes na fermentação, mas não a principal, *S. cerevisiae*, mantendo assim a fermentação alcoólica e a população de leveduras presente. Pesquisando os efeitos desta toxina,

foi encontrado que ela se liga a polissacarídeos (receptores primários da toxina), principalmente os que compõem a parede celular leveduriforme (β -1,3-glucano e β -1,6-glucano), degradando-os (ULLIVARRI; MENDOZA; RAYA, 2018). Esta proteína é rapidamente absorvida pelos receptores de parede celular em pH ácido. Depois de entrar na célula, ocorre uma interação de alta afinidade e baixa velocidade onde a toxina na membrana citoplasmática atua formando canais transmembrana catiônicos independentes de voltagem, que causam o vazamento de íons e a subsequente morte celular (MAGLIANI et al., 1997).

3.3.4 Competição por nutrientes

Um mecanismo bem elucidado e diversamente citado é a inibição de leveduras por competição por nutrientes e espaço. É um mecanismo de biocontrole, onde o agente de controle utiliza os recursos nutricionais antes do patógeno, sendo uma grande vantagem para as leveduras, pois estas têm um rápido crescimento e a capacidade de formar biofilmes, cobrindo uma grande área. Avaliado pelo *Niche Overlap Index* (NOI), que analisa a competitividade entre 2 microrganismos, sendo avaliada como coexistência e competição dependendo de seu consumo em diversas fontes de carbono. Estudo mostrando a capacidade de competição por nutrientes das leveduras mostrou que destas a *S. cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida sake*, *Debaryomyces vanrijae*, *Candida catenulata*, *Candida famata* e *Schizosaccharomyces pombe* apresentam um alto valor de NOI, indicando sua capacidade em assimilar diversas fontes de carbono, tornando assim a sua proliferação rápida se comparada a fungos filamentosos, gerando uma competição por nutrientes (NALLY et al., 2015; SPADARO; DROBY, 2016).

Outra maneira de se avaliar a competição por nutrientes é avaliar a presença de sideróforos. Sideróforos são produzidos em resposta a deficiência de ferro, mineral essencial para o crescimento fúngico, sendo cofator de diversas enzimas, importante para manter o metabolismo celular. Um ambiente com baixa concentração de ferro é a uva, então as leveduras que a colonizam produzem sideróforos, utilizando o íon Fe^{+3} presente, o deixando indisponível para fungos filamentosos, gerando assim inibição destes (NALLY et al., 2015).

3.3.5 Metabólitos secundários

Fungos podem produzir metabólitos secundários que apresentam atividade antifúngica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Destes, Ng et al. (2019) produziram extrato de leveduras de *S. cerevisiae*, e utilizando acetato de etila, extraíram os metabólitos produzidos pela levedura. Os metabólitos foram capazes de inibir as bactérias *S. aureus* e *E. coli* e identificados por cromatografia líquida com espectrofotômetro de massas sendo detectados flavonóides e compostos fenólicos. Destes, as substâncias naringenina, ácido propiônico, ácido homogentísico e fenilacetaldéido apresentaram atividade antifúngica e antioxidante.

Leveduras e fungos filamentosos produzem compostos antibióticos que são difundidos no meio de cultura onde foram inoculados. Uma metodologia simples para detectar tais compostos é inocular o microrganismo em meio de cultura sobre uma folha de papel celofane, que irá produzir tais metabólitos e dispersá-los pelo meio. Então, quando inoculado o microrganismo agonista, se não houver crescimento, significa que este produz metabólitos antibióticos que foram dispersados em meio de cultura. Fatores que podem influenciar nessa produção são pH e a composição do meio de cultura. Depois de detectar a produção de tais metabólitos os autores inocularam os fungos em meio líquido e, utilizando os solventes clorofórmio e etanol, conseguiram extrair substâncias antifúngicas, gliotoxina, viridina e tricontermina, substâncias estas utilizadas em antibióticos comerciais (DENNIS; WEBSTER, 1971).

Metabólitos também apresentam atividade antiinflamatórias. No metabólito extraído com acetato de etila, foram encontradas 3 frações, identificadas como crinipellina E, F e G (diterpenóides). Os compostos não apresentaram atividade citotóxica e reduziram a expressão de células pró-inflamatórias (como a IL-8), podendo ser utilizados para o tratamento de doenças crônicas (ROHR et al., 2017).

Ruggirello et al. (2018) avaliou se a levedura *S. cerevisiae* isolada do cacau produz metabólitos antifúngicos e os libera no meio de cultivo. Trabalhando com o meio de cultura filtrado, o testou contra *Aspergillus flavus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium griseofulvum*, *A. niger*, *A. fumigatus* em microdiluição em placa, sendo que a produção de diversos ácidos orgânicos, proteinases ou de toxina killer possivelmente foram os responsáveis pela inibição.

Não são apenas leveduras que produzem metabólitos antifúngicos. Aqueveque et al. (2017) fermentando o basidiomiceto *Stereum hirsutum* e extraíndo

seus metabólitos com acetato de etila, encontrou uma substância, a “Stereonin D”, capaz de gerar a inibição do mofo cinzento (*B. cinerea*) inibindo a esporogênese e seu crescimento micelial. Esses resultados indicam a possível utilização destes extratos contra o fungo que causa danos em diversos vegetais como, uvas, tomates, hortaliças, entre outros, sendo segura a sua manipulação e consumo.

3.4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Esses dados demonstram que é possível a utilização de leveduras e de seus produtos no controle de fungos filamentosos que causam danos em alimentos, principalmente os do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Botrytis*. Estudos relacionando a citotoxicidade e segurança destes compostos devem ser realizados, porém os resultados são promissores.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010.
- AQUEVEQUE, P.; CÉSPEDES, C.L.; BECERRA, J.; ARANDA, M.; STERNER, O. Antifungal activities of secondary metabolites isolated from liquid fermentations of *Stereum hirsutum* (Sh 134-11) against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1048-1054, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC)**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em: 28 Jul. 2017.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PULINA, G. Effects of ochratoxin A on livestock production. **Toxins**, v. 2, p. 1796-1824, 2010.
- COUTO, F. A.; DE SOUZA, S. C.; MONTEIRO, M. C. P.; DA SILVA, D. M.; CIRILLO, M. A.; BATISTA, L. R. Diversity and association of filamentous fungi in coffee beans under organic and conventional cultivation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2505-2512, 2014.
- DE BARROS, F. C.; JULIATTI, F. C. Levantamento de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia, no período 2001-2008. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 77-86, 2012.
- DE CERAIN, A. L.; GONZALEZ-PENAS, E.; JIMENEZ, A.M.; BELLO, J. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 1058–1064, 2002.
- DE FELICE, D.V.; SOLFRIZZO, M.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; VISCONTI, A.; CASTORIA, R. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. **Phytopathology**, v. 98, p. 1261–1270, 2008.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.25-39, 1971.
- DRUVEFORS, U.; JONSSON, N.; BOYSEN M.E.; SCHNÜRER, J. Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. **FEMS Yeast Research**, v.2, p. 389-394, 2002.
- DURAND, N.; EL SHEIKHA, A.F.; SUAREZ-QUIROS, M.; OSCAR, G.; NGANOU, N.D.; FONTANA-TACHON, A. Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. **Food Control**, v. 34, p. 466-471, 2013.
- EFSA (European Food Safety Authority)**. (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal, 365, 1-56.

EMBRAPA. Sobre o Tema. Controle Biológico. Brasília, 2019 em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acesso: 5 mar. 2019.

FARBO, M.G.; URGEGHE, P.P.; FIORI, S.; MARCELLO, A.; OGGIANO, S.; BALMAS, V.; HASSAN, Z.U.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin a-producing *aspergillus carbonarius* and *a. ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.284, p. 1-10, 2018.

FIORI, S.; URGEGHE, P.P.; HAMMAMI, W.; RAZZU, S.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International Journl of Food Microbiology**, v. 189, p. 45-50, 2014.

HABIBA, NOREEN, R.; ALI, S.A.; HASAN, K.A.; SULTANA, V.; ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Evaluation of biocontrol potencial of epiphytic yeast against postharvest *Penicillium digitatum* rot of stored Kinnow fruit (*Citrus reticulata*) and their effect on its physiochemical properties. **Postharvest Biology and Technology**, v.1448, p. 38-48, 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: IARC, v. 56, p. 489-452, 1993.

KHOURY A. E.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 4, p. 461–493, 2010.

LIU, S.Q.; TSAO, M. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. **Food Control**, v. 20, p. 852-855, 2009.

MAGLIANI, W.; CONTI, S. GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 369-400, 1997.

MAHUNU, G.K.; ZHANG, H.; YANG, Q.; ZHANG, X.; LI, D.; ZHOU, Y. Improving the biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* with phytic acid against postharvest blue mold and natural decay in apples. **Biological Control**, v. 92, p. 172-180, 2016.

MANUAL DE SEGURANÇA E QUALIDADE PARA A CULTURA DO CAFÉ. Projeto PAS Campo, Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 83 p. (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos).

MASOUD, W.; POLL, L.; JAKOBSEN, M. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **Yeast**, v. 22, p. 1133–1142, 2005.

MEDINA-CÓRDOVA, N.; ROSALES-MENDOZA, S.; HERNÁNDEZ-MONTIEL, L. G.; ÂNGULO, C. The potencial use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. **Biological Control**, v. 121, p. 216-222, 2018.

MITCHELL, D.; PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 439–445, 2004.

NAEBPOOR, F.; MOMENI, M.; DEHKORDI, F. S. Incidence of ochratoxin A in raw and salted dried fruits using high performance liquid chromatography. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 01-06, 2013.

NALLY, M.C.; PESCE, V.M.; MATURANO, Y.P.; RODRIGUES ASSAF, L.A.; TORO, M.E.; CASTELLANOS DE FIGUEROA, L.I.; VAZQUEZ, F. Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 91-100, 2015.

NAYAK, S.; HARSHITHA, M. J.; SAMPATH, C.; ANILKUMAR, H. S.; RAO, C. V. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 86-91, 2013.

NG, K.R.; LYU, X.; MARK, R.; CHEN, W.N. Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potencial as natural food preservatives. **Food Chemistry**, v. 270, p. 123-129, 2019.

NGANOU, N. D.; DURAND, N.; TATSADJIEU, N. L.; MÉTAYER, I.; MONTET, D.; MBOFUNG, C. M. F. Fungal flora and ochratoxin A associated with coffee in Cameroon. **Science Domain International Journal**, SDI Paper Template Version 1.6, 2012.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against grays, green and blue postharvest decays. **Food Microbiology**, v. 63, p. 191-198, 2017.

PAULUK-CORRÊA, I.; BOZZA DE ALMEIDA, A.; PIMENTEL, I.C. Biocontrol activity of yeast strains isolated from green coffee beans against ochratoxin A-producing *Aspergillus* species. **International Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 1268-1273, 2018.

PEREIRA, G.V.M.; BEUX, M.; PAGNONCELLI, M.G.B.; SOCCOL, V.T.; RODRIGUES, C.; SOCCOL, C.R. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 96-101, 2015.

PFOHL-LESZKOWICZ A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 465-483, 2009.

RAMOS, A.J.; LABERNIA, N.; MARIN, S.; SANCHÍS, V.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of

Aspergillus ochraceus on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 133–140, 1998.

RIBELIN, W.E.; FUKUSHIMA, K.; STILL, P.E. The toxicity of ochratoxin A to ruminants. **Canadian Journal of Criminology - Revue Canadienne de Criminologie**, v. 42, p. 172–176, 1978.

ROHR, M.; OLEINIKOV, K.; JUNG, M.; SANDJO, L.P.; OPATZ, T.; ERKEL, G. Anti-inflammatory tetraquinane diterpenoids from a *Crinipellis* species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 514-522, 2017.

RUGGIRELLO, M.; NUCERA, D.; CANNONI, M.; PERAINO, A.; ROSSO, F.; FONTANA, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. **Food Research International**, v. 115, p. 519-525, 2019.

SIMONCINI, N.; PINNA, A.; TOSCANI T.; VIRGILI, R. Effect of added autochthonous yeasts on the volatile compounds of dry-cured hams. **International Journal of Food Microbiology**, v. 212, p.25-33, 2015.

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, v.47, p.39-49, 2016.

TANIWAKI, M.H.; TEIXEIRA, A.A.; TEIXEIRA, A.R.R.; COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161–166, 2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM S. PILETSKY S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168-180, 2009.

ULLIVARRI, M.F.; MENDOZA, L.M.; RAYA, R.R. Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potencial biocontrol agent against wine spoilage yeasts. **Biological Control**, v. 121, p.223-228, 2018.

VELMOUROUGANE K.; BHAT, R.; GOPINANDHAN, T.N.; PANNERSELVAM, P. Management of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. **Biological Control**, v. 57, p. 215-221, 2011.

WANG, M.; ZHAO, L.; ZHANG, X.; DHANASEKARAN, S.; ABDELHAI, M. H.; YANG, Q.; JIANG, Z. ZHANG, H. Study on biocontrol of postharvest decay of table grapes caused by *Penicillium rubens* and the possible resistance mechanism by *Yarrowia lipolytica*. **Biological Control**, v. 130, p. 110-117, 2019.

WERNER, S.; POLLE, A.; BRINKMANN, N. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 8651-8665, 2016.

ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125–132, 2015.

CAPÍTULO 2 - BIOCONTROLE DE LEVEDURAS ISOLADAS EM GRÃOS DE CAFÉ VERDE CONTRA ESPÉCIES DE *Aspergillus* PRODUTORAS DE OCRATOXINA A

PAULUK-CORRÊA, I.; BOZZA DE ALMEIDA, A.; PIMENTEL, I.C. Biocontrol activity of yeast strains isolated from green coffee beans against ochratoxin A-producing *Aspergillus* species. **International Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 1268-1273, 2018.

RESUMO

O café é um dos produtos mais consumidos no mundo, porém quando processado de maneira inadequada pode ser contaminado com fungos produtores de ocratoxina A (OTA), como as espécies de *Aspergillus*. As leveduras *Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Meyerozyma caribbica*, *Hyphopichia burtonii* e *Aureobasidium pullulans* foram isoladas de grãos de café verde e co-inoculadas com os fungos *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*, produtores de OTA. A inibição do crescimento, bem como a produção de compostos voláteis foram avaliados. As leveduras *W. anomalus*, *M. caribbica* e *H. burtonii* apresentaram os melhores resultados. Estas leveduras têm o potencial de inibir o crescimento e reduzir a produção de OTA por fungos que ocorrem naturalmente nos grãos de café.

Palavras-chave: Micotoxinas, *Wickerhamomyces anomalus*, *Hyphopichia burtonii*, *Coffea arabica*, Compostos voláteis.

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos mais importantes no mercado mundial, especialmente para países subtropicais (ICO 2016). O café arábica responde pela maior parte da produção global, e o método de processamento por via seca é frequentemente usado (ICO 2016). Estudos comparando diferentes práticas pós-colheita indicam que 92% dos grãos processados com este método estavam contaminados com fungos (SUÁREZ-QUIROZ et al., 2004). Isso acontece porque no processamento pela via seca, a casca e a mucilagem não são separadas dos grãos de café enquanto secam diretamente ao sol, em terreiros, e portanto a contaminação pode ocorrer, já que a mucilagem do café fornece um bom substrato para muitos microrganismos (SILVA et al., 2000; SIVETZ; FOOTE, 1963). Vários microrganismos foram isolados dos grãos de café em diferentes estágios de maturação, como fungos, leveduras e bactérias (IAMANAKA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; SILVA et al., 2013; TANIWAKI et al., 2014). Entre eles estão os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, produtores de ocratoxina A (OTA), um metabólito secundário que ocorre facilmente na natureza, podendo ser produzido durante o armazenamento em resposta a mudanças de temperatura e umidade (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010; SUBRAMANIAM; RAMPITSCH, 2013; WHITFIELD, 1998). A OTA é nefrotóxica, hepatotóxica e potencialmente causadora de câncer, sendo relacionada à nefropatia endêmica dos Balcãs (doença renal irreversível) (IARC, 1993). A OTA é comumente encontrada em alimentos, como uvas, cacau e café, e é resistente a altas

temperaturas, dificultando o seu controle (ROMANI et al., 2000; SERRA; MENDONCA; VENANCIO, 2006; TAFURI; FERRACANE; RITIENI, 2004). O uso de produtos químicos para inibir o crescimento de fungos produtores de OTA e a contaminação desta em alimentos foi proibida ou limitada em vários países (ZHANG et al., 2011). Nesse cenário, as leveduras produzem metabólitos secundários que surgem como alternativas para controlar fungos potencialmente toxigênicos durante os processos pré e pós-colheita (ZHU et al., 2015). Isto ocorre principalmente devido à sua capacidade de crescer em condições adversas, como pH alto e baixo, e longos períodos em condições de armazenagem e anaeróbicas (DRUVEFORS; PASSOTH; SCHNURER, 2005; FREDLUND et al. 2002). Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da levedura em inibir o crescimento de espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTURAS

As leveduras foram isoladas de grãos de café verde (*Coffea arabica*) coletado em 2011 no Instituto Agronômico do Paraná, localizado em Londrina, PR, Brasil (Latitude 23.22 S - Longitude 51.10 W). As leveduras foram identificadas como *Wickerhamomyces anomalus*, *Hyphopichia burtonii*, *Meyerozyma caribbica*, *Aureobasidium pullulans*, *Meyerozyma guilliermondii* depositados na coleção microbiológica da Rede Paranaense (TaxOnline) (TABELA 1).

TABELA 1 - Leveduras isoladas de grãos de café

Código	Espécie de levedura	Número de acesso GenBank
CAT 1 L1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KP638728
103 3 L1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KP638741
102 1 L2B	<i>Hyphopichia burtonii</i>	KP638740
102 2 L2	<i>Hyphopichia burtonii</i>	KP638737
102 2 L1	<i>Hyphopichia burtonii</i>	KP638729
102 1 L1	<i>Hyphopichia burtonii</i>	KP638735
CAT 2 L1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	KP638738
102 3 L1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	KP638733
104 3 L1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP638730
106 3 L2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP638731
102 1 L2N	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP638732
104 3 L2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP638734
107 1 F1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KP638727

FONTE: A autora (2015)

A linhagem referência de *Aspergillus ochraceus* produtora de OTA, INCQS 40013 (ATCC 22947), foi obtida do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil e a linhagem de *Aspergillus carbonarius* produtora de OTA 187 UEL foi fornecida pelo Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil. As leveduras e fungos foram armazenados a 4 °C.

2.2 MEIOS DE CULTURA

Quatro meios de cultura foram utilizados neste estudo: ágar *Sabouraud* (SB), ágar *Czapek Dox* (CZA), ágar Café (CA) e ágar tampão de citrato YEPD-MB-Fosfato (YEPD). O primeiro foi utilizado nos testes de inibição e é composto de 40 g/L de glicose, 15 g/L de peptona, 10 g/L de ágar. O CZA foi utilizado em testes de inibição e é composto por 30 g/L de sacarose, 2 g/L de nitrato de sódio, 1 g/L de fosfato dipotássico, 0,5 g/L de sulfato de magnésio, 0,5 g/L de cloreto de potássio, 0,01 g/L de sulfato de ferro e 15 g/L de ágar. O CA, também utilizado em testes de inibição, foi preparado fervendo 20 g de grãos de café verde em 1 litro de água, sendo depois filtrado com um filtro de 0,45 mm. A água coletada foi misturada com 15 g/L de ágar.

O YEPD, utilizado na detecção da produção de metabólitos, preparado usando 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L dextrose, 0,01 g/L de azul de metileno, 0,1 M de tampão fosfato citrato até pH 4 e 20 g/L ágar.

2.3 EFEITO INIBITÓRIO DE LEVEDURAS NOS MEIOS SB, CZA E CA

As leveduras foram inoculadas nos três meios de cultura por 48 horas a 28 °C e então transferidas para tubos contendo solução salina a 0,85% em uma concentração de 1×10^6 células/mL (contado em hemocitômetro). Os fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius* foram inoculados em meio SB por 7 dias a 28 °C. Um mililitro de suspensão de levedura foi adicionado a 5 mL do meio de cultura fundido onde a levedura foi inoculada, e a suspensão foi espalhada sobre uma placa de Petri contendo 15 mL do mesmo meio de cultura. Um disco de 4 mm de diâmetro foi removido do centro de cada placa e 10 µL de uma suspensão de *A. ochraceus* ou *A. carbonarius* (1×10^6 esporos/mL) foram adicionados. As placas de testes foram incubadas por 7 dias a 28 °C e o crescimento de *Aspergillus* sp. foi avaliada. O teste foi realizado triplicata, e como controle foram incubadas placas contendo apenas os fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius* (ZHU et al., 2015).

Os diâmetros das colônias de *Aspergillus* sp. foram medidos para determinar a porcentagem de inibição usando a fórmula $(PI\%) = ((Dc - Dt) / Dc) \times 100$, onde Dt, diâmetro da colônia de *Aspergillus* sp. no teste de inibição e Dc o diâmetro da colônia controle de *Aspergillus* sp. (EDGINTON; KNEW; BARRON, 1971)

2.4 EFEITO INIBITÓRIO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR LEVEDURAS

Leveduras e fungos foram inoculados em SB, incubados por 48 horas (leveduras) e 7 dias (fungos) a 28 °C, em seguida foram transferidos para tubos contendo solução salina a 0,85% para obtenção de suspensões nas concentrações de 1×10^6 células/mL e 1×10^6 esporos/mL. Suspensões de levedura (100 µL) foram espalhadas em placas contendo ágar SB, enquanto em outra placa contendo o mesmo meio, um disco de 4 mm foi removido do centro e 10 µL da suspensão de *A. ochraceus* ou *A. carbonarius* foram adicionados, sem o contato direto entre os microrganismos. As placas foram vertidas umas nas outras e vedadas para evitar o

vazamento de compostos voláteis produzidos por leveduras. O material foi incubado a 28 °C por 14 dias e o crescimento de *Aspergillus* sp. foi medido aos 7 e 14 dias de teste (ZHU et al., 2015). O ensaio foi realizado com três repetições e placas contendo apenas a linhagem de *Aspergillus* spp. foram utilizadas como controle para a determinação da porcentagem de inibição utilizando a fórmula indicada no item 2.3

2.5 ANÁLISE DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE LEVEDURAS SELECIONADAS EM GRÃOS DE CAFÉ VERDE CONTRA *Aspergillus* sp.

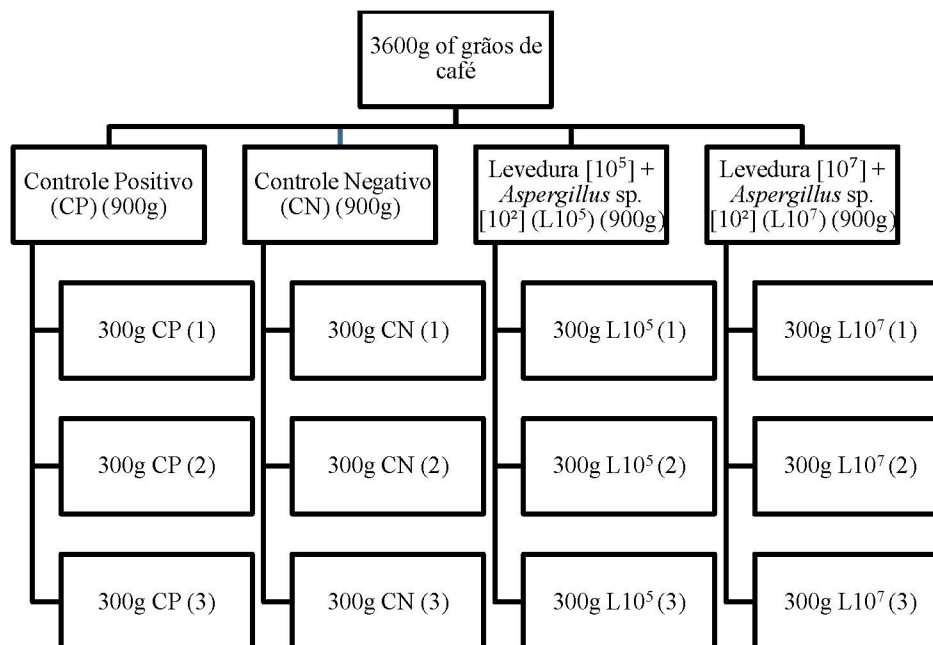
2.5.1 Preparo de inóculo

A levedura com as maiores taxas de inibição, *W. anomalus* - CAT 1 L1 foi selecionada para os testes em grãos de café. A levedura foi inoculada por 48 horas e o fungo *Aspergillus* sp. por 7 dias em placas contendo ágar SB, após este período, foram transferidos para tubos contendo 0,05% de *Tween* 80. Para o preparo de suspensões de 1×10^5 e 1×10^7 células/mL para levedura, e 1×10^2 esporos/mL para o fungo (PASTER et al., 1993).

2.5.2 Preparo dos grãos de café

Os grãos passaram por uma desinfecção superficial para garantir que apenas os microrganismos inoculados cresceriam em sua superfície. Os grãos de café verde foram desinfetados com água autoclavada, álcool (70%) e hipoclorito (3,5%) em fluxo laminar, onde permaneceram secando sobre um filtro de papel estéril por 1 hora, onde alíquotas de 300g foram preparadas para o início do teste (

FIGURA 1) (PASTER et al. 1993).

FIGURA 1 - Desenho experimental do teste de inibição de espécies de *Aspergillus* em grãos de café

FONTE: A autora (2019)

2.5.3. Inoculação em grãos de café

Os grãos de café foram imersos por 2 minutos em 500 mL de uma suspensão de levedura. Para os controles negativos, os grãos foram imersos por 2 minutos em 500ml de uma suspensão de *Tween* 80 (0,05%). Após a secagem em fluxo laminar, 5 mL de uma suspensão de *Aspergillus* sp. foi pulverizada sobre os grãos de café, que foram secados em fluxo laminar sobre um filtro de papel esterilizado. Os grãos foram armazenados em sacos de juta, incubados a 26°C e 75% de umidade (mimetizando as condições de armazenados a campo) por 24 dias, o experimento foi realizado em triplicata (PASTER et al., 1993).

O crescimento de *Aspergillus* sp. foi avaliado a cada 2 dias coletando 10 gramas de grãos de café e examinando sob microscópio estereoscópio e o resultado expresso em porcentagem (Zeiss, Germany).

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) foi realizada usando um delineamento inteiramente casualizado. Havendo significativas no teste F, as análises foram

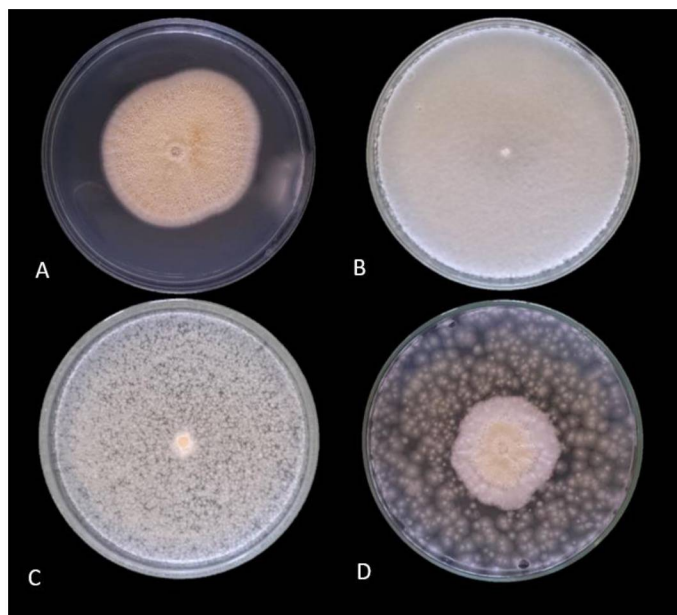
seguidas pelo teste de Tukey ($p < 0,01$), utilizando-se o software estatístico ASSISTAT versão 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO INIBITÓRIO DE LEVEDURAS NOS MEIOS SB, CZA E CA.

Todas as leveduras utilizadas foram capazes de inibir as espécies de *Aspergillus* em pelo menos um meio de cultura (GRÁFICO 1, FIGURA 2).

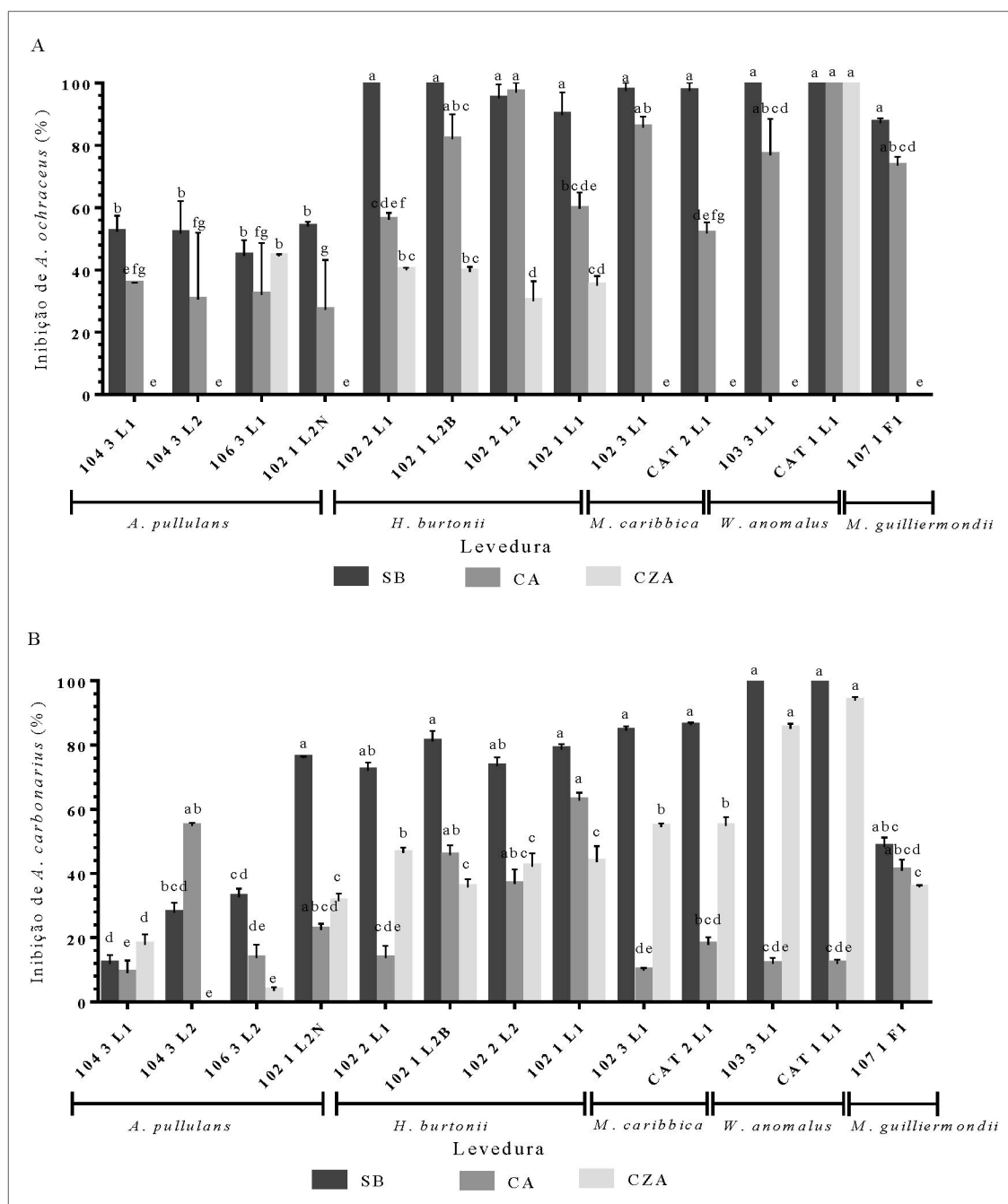
FIGURA 2 - Teste de inibição de leveduras isoladas de grãos de café frente a *A. ochraceus* em meio Sabouraud



FONTE: A autora (2018)

NOTAS: (A) controle de *A. ochraceus*, (B) inibição por *W. anomalus*, (C) inibição por *M. caribbica* e (D) inibição por *A. pullulans*.

GRÁFICO 1 - Porcentagens de inibição de *A. ochraceus* (A) e *A. carbonarius* (B) nos meios de cultura SB, CA e CZA



FONTE: A autora (2018)

NOTAS: Diferentes letras no mesmo meio de cultura indicam significância detectado pelo teste de Tukey ($P < 0.01$).

Nossos resultados indicam que as porcentagens de inibição de *A. ochraceus* (média de 82.29% para SB, 62.15% para CA, e 22.23% para CZA) foram mais altas se comparada a inibição de *A. carbonarius* (média de 66.89% para SB, 26.29% para CA e 41.43% para CZA), resultados similares foram alcançados por Zhu et al. (2015).

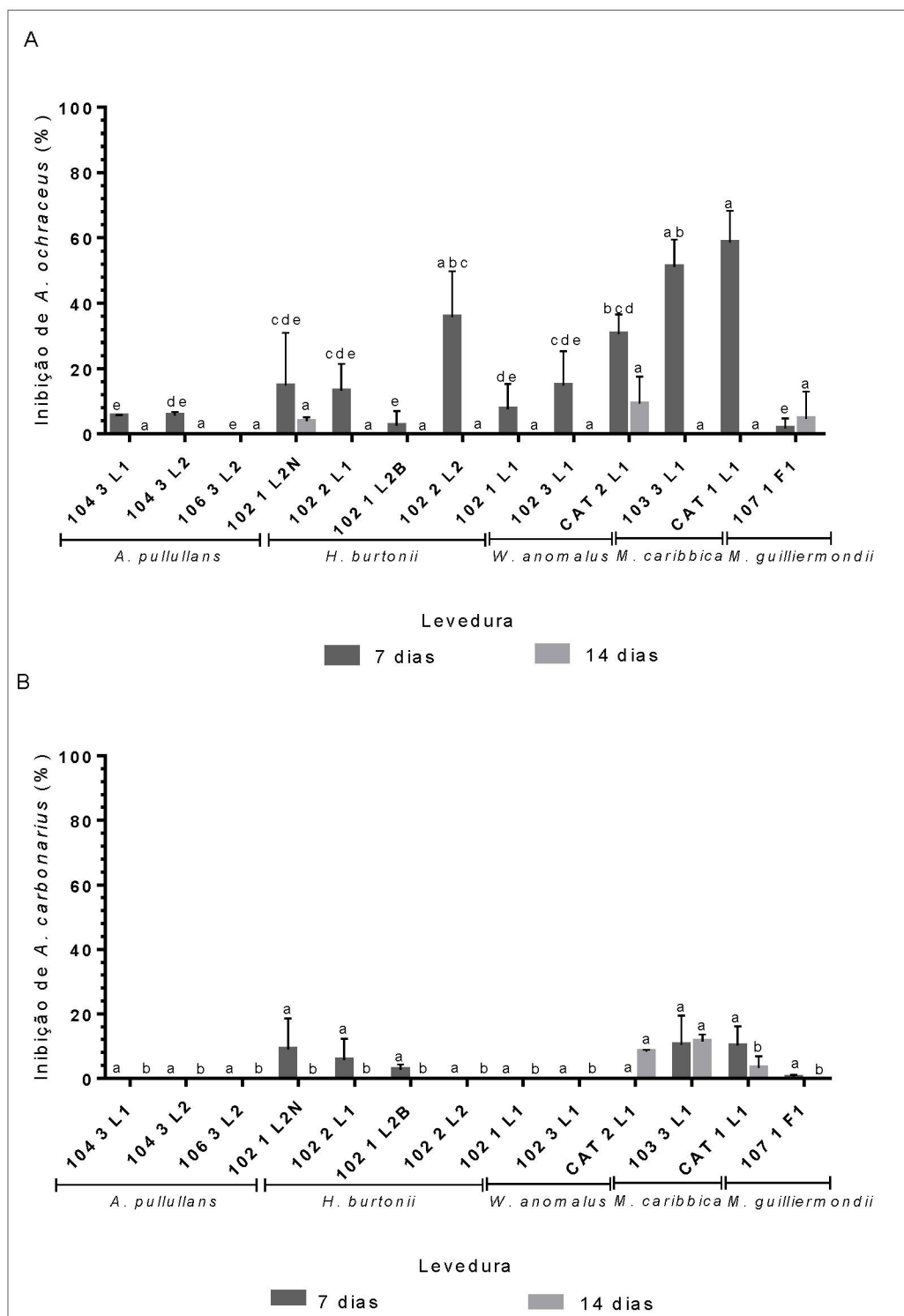
Os melhores resultados foram obtidos utilizando ágar SB, com inibição variando entre 44,65 e 100% para *A. ochraceus* e 8,95 a 100% para *A. carbonarius*. Quanto ao ágar CZA, a inibição foi maior para *A. carbonarius* (variando de 3,45 a 93,84%), sendo os melhores resultados obtidos com a levedura *W. anomalus* (93,84% para CAT 1 L1 e 85,13% para 103 3 L1). Para o ágar CA, a inibição de *A. carbonarius* foi maior com *H. burtonii* (102 1 L1), enquanto que para *A. ochraceus*, a inibição foi maior com *W. anomalus* (CAT 1 L1).

Meios de cultura com alta concentração de carbono (SB) induzem o crescimento de leveduras, consequentemente inibindo *A. ochraceus* e *A. carbonarius* (MASOUD; KALTOFT, 2006). Comparando nossos resultados em CA e CZA, a inibição de *A. ochraceus* foi maior com o primeiro meio, sugerindo que as leveduras crescem melhor em um ambiente similar ao que foram isoladas. Estudos mostram que a cafeína pode controlar o crescimento de leveduras, o que pode ser confirmado pelos resultados de inibição quando CA produz menos inibição em comparação com SB (VEGA et al., 2003). O ágar SB apresenta maior concentração de carbono em comparação com os de outros meios utilizados e teve os melhores resultados, indicando que um grande nível de nutrientes promove o crescimento de leveduras e, consequentemente, a inibição de *Aspergillus*, sendo assim o ágar SB foi selecionado para ser utilizados nos testes posteriores.

3.2 EFEITO INIBITÓRIO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR LEVEDURAS

As leveduras isoladas produziram compostos voláteis que inibiram o crescimento de *A. ochraceus* e *A. carbonarius*. As porcentagens de inibição foram maiores para *W. anomalus* (CAT 1 L1) contra *A. ochraceus* em 7 dias (58,2%). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as inibições de *A. carbonarius* em 7 dias. Duas leveduras foram estatisticamente superiores às demais em 14 dias de teste, *W. anomalus* (8,38%) (CAT 2 L1) e *M. caribbica* (11,33%) (103 3 L1) (GRÁFICO 1 e FIGURA 2).

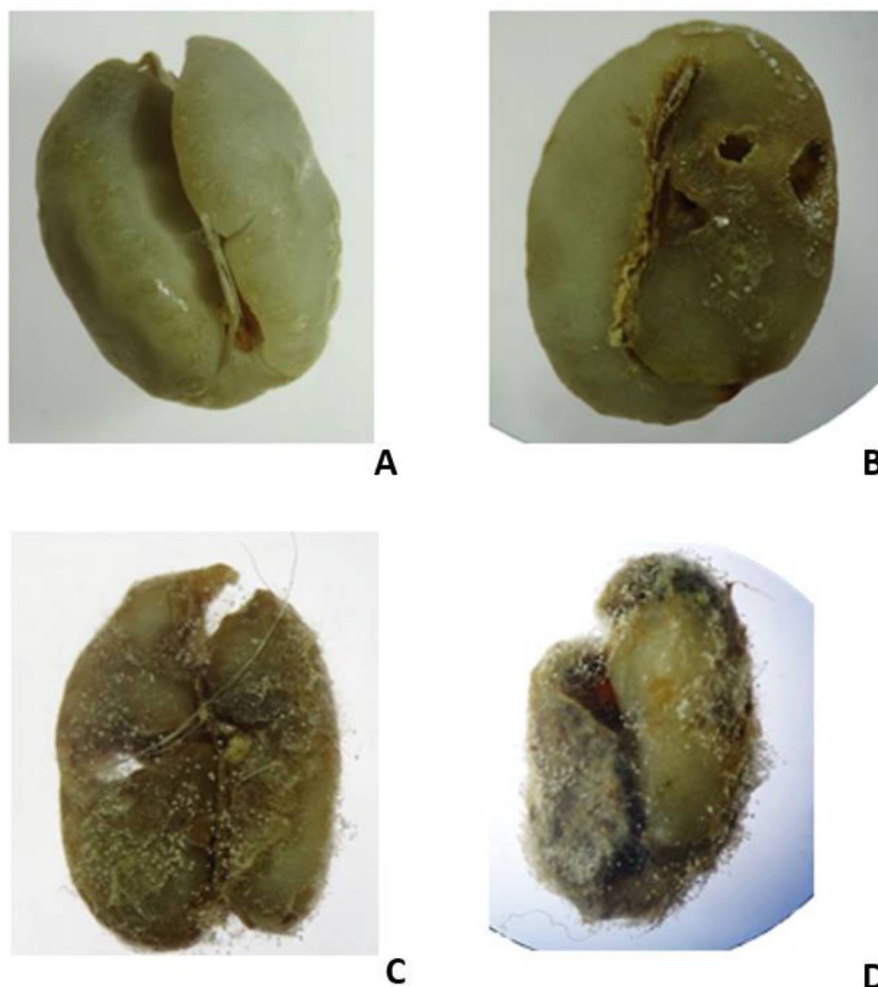
GRÁFICO 1 - Porcentagens de inibição de *A. ochraceus* (A) e *A. carbonarius* (B) por compostos voláteis produzidos por leveduras isolada de grãos de café



FONTE: A autora (2018)

NOTAS: Diferentes letras indicam diferenças significativas de cada período pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

FIGURA 3 -- Análise do potencial inibitório de *W. anomalus* frente ao fungo *A. ochraceus*



FONTE: A AUTORA (2018)

NOTAS: (A) Controle negativo (grão não inoculado) (B) Levedura na concentração 10^5 células/mL (C) Crescimento de *A. ochraceus* (D) Crescimento de *A. carbonarius*

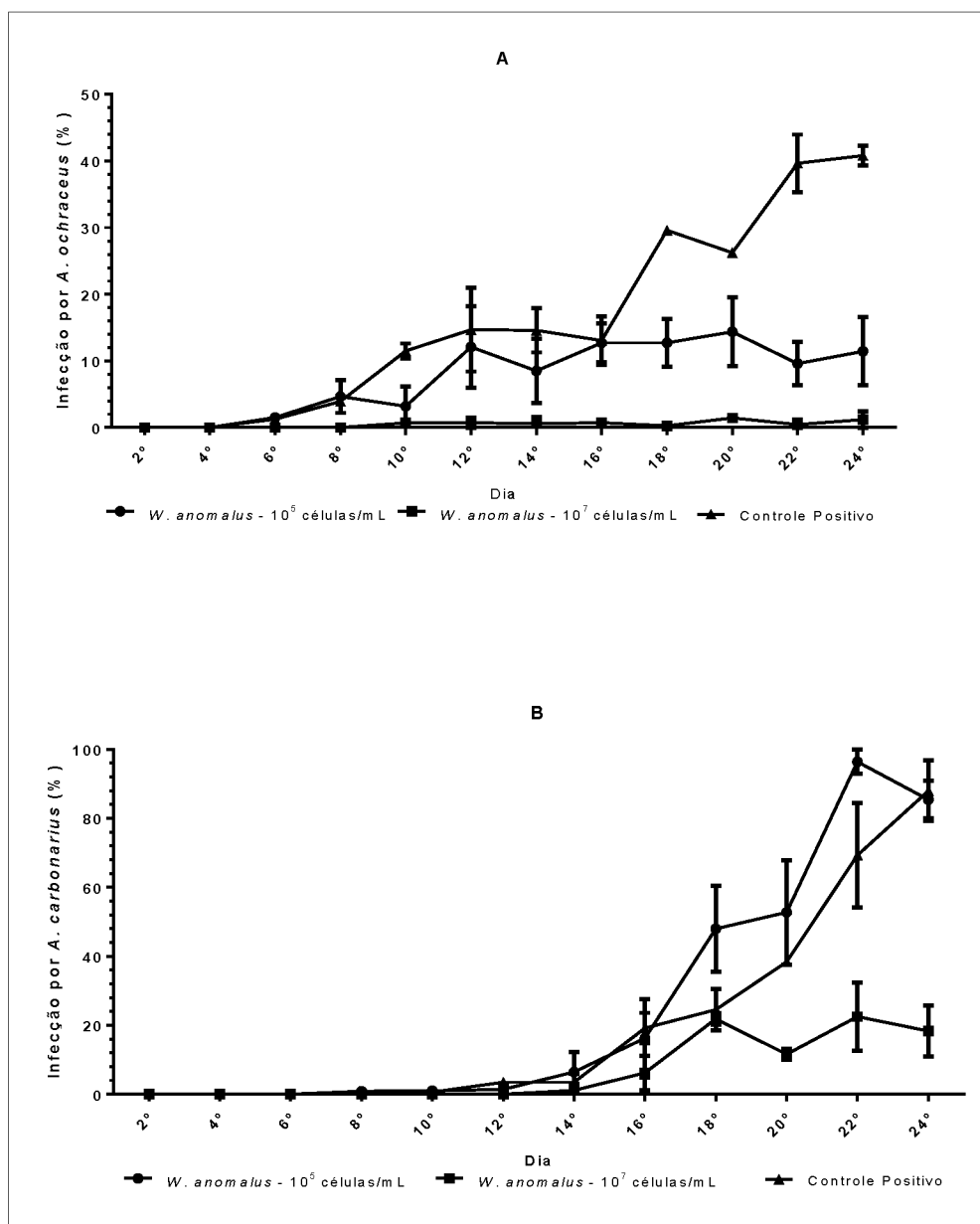
Compostos voláteis produzidos por leveduras têm baixo peso molecular e, portanto, podem facilmente evaporar em condições normais de temperatura e pressão (WANG et al., 2013). Em nosso estudo, compostos voláteis de leveduras inibiram espécies de *Aspergillus* e, segundo Hua et al. (2014), eles podem afetar a germinação de esporos, crescimento micelial, produção de toxinas e expressão gênica. Estudos mostraram que o *A. ochraceus* é inibido pelo composto de levedura volátil, especialmente aqueles produzidos por *W. anomalus*, que induziram as maiores taxas de inibição, em comparação com *P. kluyveri* e *Hanseniaspora uvarum* (MASOUD; POLL; JAKOBSEN, 2005). Parafati et al. (2017) usaram compostos voláteis de *W. anomalus* e *A. pullulans* contra *B. cinerea*, *P. digitatum* e *P. italicum*. Após contato direto entre uma suspensão de fungos e leveduras, a germinação dos conídios foi

avaliada, revelando que *W. anomalus* inibiu fortemente a germinação de esporos dos 3 fungos testados (porcentagem de germinação abaixo de 7%), *A. pullulans* também inibiu o crescimento de fungos, mas com maiores porcentagens de germinação.

3.3 ANÁLISE DO POTENCIAL INIBITÓRIO DE LEVEDURAS SELECIONADAS EM GRÃOS DE CAFÉ VERDE CONTRA *Aspergillus* sp.

A porcentagem de infecção de *A. ochraceus* e *A. carbonarius* nos grãos de café armazenados juntamente com a levedura *W. anomalus* foi calculada avaliando o crescimento fúngico (GRÁFICO 2). Os resultados indicaram que *W. anomalus* (CAT 1 L1) em ambas as concentrações utilizadas foi eficaz na inibição de *A. ochraceus* durante os 24 dias testados, quando comparado ao controle positivo. A taxa de crescimento de *A. ochraceus* foi de 40% para o controle positivo e 11% no teste com levedura na concentração de 10^5 células/mL e 1,26% para o teste usando a levedura na concentração de 10^7 células/mL. A levedura inoculada na concentração de 1×10^7 células/mL induziu a maior redução no crescimento de *A. ochraceus*.

GRÁFICO 2 - Porcentagem de infecção de *A. carbonarius* (A) e *A. ochraceus* (B) em grãos de café inoculados com *W. anomalus*



FONTE: A autora (2018)

Em relação à infecção por *A. carbonarius*, o crescimento fúngico foi de 25% quando a levedura foi inoculada na concentração de 1×10^5 células/mL, e na maior concentração (1×10^7 células/mL) o *A. carbonarius* foi inibido com porcentagem de crescimento de 6%. Comparando-se a porcentagem de crescimento de *A. carbonarius* no controle positivo (20%) com o teste com levedura na concentração de 10^5 células/mL (25%), observa-se que a concentração de levedura não foi suficiente para inibir o fungo, e esta concentração pode ainda ter gerado uma condição de estresse para o fungo, o que pode ter levado a uma indução da produção de OTA. Estudos

indicam que o gene *otapksPV* (relacionado à produção de OTA) é regulado pela estimulação ambiental, sugerindo que a inibição não ocorreu nessa concentração porque o fungo pode ter produzido OTA, causando danos à levedura (SCHMIDT-HEYDT et al., 2007; SCHMIDT-HEYDT; STOOL; GEISEN, 2013).

Leveduras isoladas de grãos de café verde são uma alternativa promissora para inibir os fungos produtores de micotoxina em grãos de café, pois podem prevenir a produção de OTA e já são usadas na fermentação do café (PEREIRA et al. 2015). A inoculação dessas leveduras em grãos de café armazenados não altera a qualidade do café e pode prevenir a proliferação de fungos em condições de armazenamento (VELMOURUGANE; BHAT; GOPINANDHAN, 2011). Além disso, crescem facilmente em meios líquidos, viabilizando a produção em larga escala. Mais estudos são necessários para identificar os metabólitos ativos dos isolados de levedura e aplicá-los para inibir o *Aspergillus* spp. em grãos de café armazenados.

4 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que leveduras isoladas de grãos de café verde inibiram *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, sendo uma alta concentração de levedura necessária para inibir o crescimento de fungos nos grãos de café. Foi demonstrado que a aplicação de leveduras, especialmente *W. anomalus*, é viável e apresenta um potencial de serem usadas como agentes de biocontrole.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010.
- DRUVEFORS, U.; PASSOTH, V.; SCHNURER, J. Nutrients effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1865-1869, 2005.
- DURAND, N.; EL SHEIKHA, A.F.; SUAREZ-QUIROS, M.; OSCAR, G.; NGANOU, N.D.; FONTANA-TACHON, A. Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. **Food Control**, v. 34, p. 466-471, 2013.
- EDGINTON, L.V.; KNEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 62, p. 42-44, 1971.
- EFSA (European Food Safety Authority)**. (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal, 365, 1-56.
- FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M.E.; LINGSTEN, K.J.; SCHNURER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 395-402, 2002.
- HUA, S.S.T.; BECK, J.J.; SARREAL, S.B.L.; GEE, W. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. **Mycotoxin Research**, v. 30, p. 71-78, 2014.
- IAMANAKA, B.T.; TEIXEIRA, A.A.; TEIXEIRA, A.R.R.; COPETTI, M.V.; BRAGAGNOLO, N.; TANIWAKI, M.H. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research International**, v. 62, p. 353-358, 2014.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC)**. Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: IARC, v. 56, p. 489-452, 1993.
- ICO (International Coffee Organization)**. (2016). Online reference included in article [Historical Data] URL <http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/2a-exports.pdf>. Accessed 09/12/2016.
- MASOUD, W.; KALTOFT, C.H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 229–234, 2006.
- MASOUD, W.; POLL, L.; JAKOBSEN, M. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth

and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **Yeast**, v. 22, p. 1133-1142, 2005.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against grays, green and blue postharvest decays. **Food Microbiology**, v. 63, p. 191-198, 2017.

PASTER, N.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; MENASHEROV, M.; NITZAN, R.; WILSON, C.L. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. **Microbiology Research**, v. 97, p. 1201-1206, 1993.

PEREIRA, G.V.M.; BEUX, M.; PAGNONCELLI, M.G.B.; SOCCOL, V.T.; RODRIGUES, C.; SOCCOL, C.R. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. **Letters of Applied Microbiology**, v. 62, p. 96-101, 2015.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; CHAVES LOPEZ, C.; PINNAVAIA, G.G.; DALLA ROSA, M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3616-3619, 2000.

SCHMIDT-HEYDT, M.; STOOL, D.; GEISEN, R. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 407-412, 2013.

SCHUMIDT-HEYDT, M.; BAXTER, E.; GEISEN, R.; MAGAN, N. Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and *otapksPV* gene expression by *Penicillium verrucosum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 199, p. 277-283, 2007.

SERRA, R.; MENDONCA, C.; VENANCIO, A. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 35-39, 2006.

SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 251-260, 2000.

SILVA, C.F.; VILELA, D.M.; CORDEIRO, C.S.; DUARTE, W.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 235-247, 2013.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, p. 71-78, 2002.

SIVETZ, M. & FOOTE, H.E. (1963). *Coffee Processing Technology*. Pp. 48-99. Connecticut, USA: The Avi Publishing Company

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 501-507, 2004.

SUBRAMANIAM, R.; RAMPITSCH, C. Towards systems biology of mycotoxin regulation. **Toxins**, v. 5, p. 675-682, 2013.

TAFURI, A.; FERRACANE, R.; RITIENI, A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. **Food Chemistry**, v. 88, p. 487-494, 2004.

TANIWAKI, M.H.; TEIXEIRA, A.A.; TEIXEIRA, A.R.R.; COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161-166, 2014.

VEGA, F.E.; BLACKBURN, M.B.; KURTZMAN, C.P.; DOWD, P.F. Identification of a coffee berry borer-associated yeast: does it break down caffeine? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.107, p. 19-24, 2003.

VELMOUROUGANE K.; BHAT, R.; GOPINANDHAN, T.N.; PANNERSELVAM, P. Management of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. **Biological Control**, v. 57, p. 215-221, 2011.

WANG, C.; WANG, Z.; QIAO, X.; LI, Z.; LI, F.; CHEN, M.; WANG, Y.; HUANG, Y.; CUI, H. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, p. 45-51, 2013.

WHITFIELD, F.B. Microbiology of food taints. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, p. 31-51, 1998.

ZHANG, D.; SPADARO, D.; GARIBALDI, A.; GULLINO, M.D. Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. **Biological Control**, v. 57, p. 193-201, 2011.

ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125-132, 2015.

**CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
H. burtonii FRENTE A ESPÉCIES DE *Aspergillus*.**

RESUMO

Leveduras são microrganismos conhecidos por colonizar diversos ambientes e matrizes alimentares. Dentre estas, as leveduras isoladas de grãos de café apresentam uma variedade de funções, como atividade inibitória contra fungos filamentosos. Analisando a capacidade inibitórias dessas, criou-se a hipótese que elas produzem metabólitos responsáveis por tal inibição. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os metabólitos das leveduras isoladas de grãos de café na inibição dos fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius*. Para isso, 13 leveduras foram inoculadas em meio líquido e após o período de incubação, foi realizada a extração dos metabólitos produzidos por estas utilizando acetato de etila. Dentre as leveduras utilizadas, os metabólitos de *H. burtonii* apresentaram as maiores porcentagens de inibição contra *A. ochraceus* e *A. carbonarius*. Identificando os componentes deste metabólito, foram encontrados feniletanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol e ácido butanóico, e dentre estes o feniletanol foi apontado como a substância responsável por tais inibições. Ainda foi avaliada a toxicidade do metabólito frente a linhagens de células (HeLa, HEPG2, HRT18, McCoy) onde uma alta concentração de metabólito foi necessária para gerar danos a elas, indicando que o metabólito não apresenta ação citotóxica acentuada sobre as linhagens celulares testadas. Esses resultados indicam que a utilização de metabólitos produzidos por leveduras na inibição de fungos do gênero *Aspergillus* é viável, já que estes têm ação contra os fungos filamentosos e não contra células tumorais e não tumorais.

Palavras-chave: Metabólitos, *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *Hyphopichia burtonii*, Compostos voláteis.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos conhecidos como a causa de vários danos, tanto para a saúde como para a agricultura (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Dentre estes fungos estão os do gênero *Aspergillus*, que apresentam uma grande variedade de consequências, podendo agir como um patógeno oportunista causando aspergilose (pela inalação de seus esporos por indivíduos imunocomprometidos), além de serem produtores de micotoxinas em alimentos (ocratoxina e aflatoxina) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

O crescimento de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em grãos pode levar à produção de micotoxinas, como a ocratoxina A (OTA), micotoxina comumente encontrada em grãos de café e trigo (MAJDINASAB et al., 2015). Quando ingerida, a OTA é rapidamente absorvida e sua eliminação é renal, onde é acumulada, gerando

doença renal crônica que pode causar vários tumores, como o de pélvis renal e bexiga (EFSA, 2006; GALTIER; ALVINERIE; CHARPENTEAU, 1981; PFOHL-LESZKOWICZ, 2009). Estudos recentes indicam a ação tóxica da OTA no corpo humano, incluindo estresse oxidativo, dano ao DNA e às proteínas (TAO et al., 2018). A OTA pode estar presente nos alimentos em todo o mundo, pois os fungos que a produzem têm a capacidade de crescer em diversas condições climáticas (ABRUNHOSA; PATERSON; VENÂNCIO, 2010). Esta micotoxina é termotolerante, o que dificulta sua degradação (PATERSON; LIMA; TANIWAKI, 2014). A OTA presente no café está relacionada às condições de pós-colheita e armazenamento, bem como aos processos de secagem e transporte (DURAND et al., 2013). Para evitar a sua produção, é necessário um controle restrito no processamento e armazenamento dos grãos, uma vez que a OTA pode ocorrer em diversos locais e em diferentes climas e condições higiênico-sanitárias (LASRAM et al., 2016).

Nesse contexto, a alternativa de utilizar o controle biológico para evitar a contaminação dos grãos de café pós-colheita pode ser utilizada, pois o uso de produtos químicos tem sido cada vez mais restrito em virtude das 3 milhões de pessoas no mundo anualmente intoxicadas por esses produtos (ITC, 2011). O uso de leveduras neste controle deve ser considerado por sua capacidade de tolerar ambientes com sal, pH e temperatura extremos (WALKER et al., 2011).

Leveduras demonstram potencial de serem utilizadas no controle biológico, tais como as leveduras isoladas de grãos de cacau (*Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida etanolica* e *Haniseniaspora uvarum*) capazes de inibir espécies de *Aspergillus*, *Mucor* e *Penicillium* que podem contaminar naturalmente o produto durante sua fermentação foram selecionadas para serem usadas como agentes de controle biológico contra os fungos (RUGGIRELLO et al., 2019). Analisando as propriedades dos compostos produzidos pela levedura *S. cerevisiae*, Ng et al. (2019) verificaram que o extrato obtido com acetato de etila possuía compostos fenólicos utilizados na indústria alimentícia, onde foram identificados como fenilacetaldéido (aditivo alimentar para fragrâncias), ácido fluorético e ácido homogentísico (antioxidantes) capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, a união de leveduras e fungos filamentosos pode ser harmônica e sinérgica, conforme apresentado por Nobre et al. (2018), estudo em que a *S. cerevisiae* foi co-inoculada com o fungo *Aspergillus ibericus* para a produção de fruto-oligossacarídeos (um prebiótico). A co-

inoculação dos microrganismos foi benéfica pois o fungo produz os fruto-oligossacarídeos enquanto a levedura a purifica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial inibitório dos compostos produzidos por leveduras no controle de crescimento de *Aspergillus* produtores de OTA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As leveduras utilizadas neste trabalho foram isoladas de grãos de café verde (*Coffea arábica*) coletados em Londrina, Paraná, Brasil (Latitude 23.22 S - Longitude 51.10 W). Treze leveduras foram isoladas e identificadas como *Wickerhamomyces anomalus*, *Hyphopichia burtonii*, *Meyerozyma caribbica*, *Aureobasidium pullulans* e *Meyerozyma guilliermondii* depositados na coleção microbiológica da Rede Paranaense (TaxOnline) (TABELA 2).

TABELA 2 - Leveduras isoladas de grãos de café

Código	Espécie de levedura	Número de acesso GenBank
CAT 1 L1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KP638728
103 3 L1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	KP638741
102 1 L2B	<i>Hyphopichia burtonii</i>	KP638740
102 2 L2	<i>Hyphopichia burtonii</i>	KP638737
102 2 L1	<i>Hyphopichia burtonii</i>	KP638729
102 1 L1	<i>Hyphopichia burtonii</i>	KP638735
CAT 2 L1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	KP638738
102 3 L1	<i>Meyerozyma caribbica</i>	KP638733
104 3 L1	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP638730
106 3 L2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP638731
102 1 L2N	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP638732
104 3 L2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	KP638734
107 1 F1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KP638727

FONTE: A autora (2015)

O fungo *A. ochraceus* 40013 (ATCC 22947), potencialmente produtor de OTA, foi doado pela Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), e a linhagem *A. carbonarius* (187 UEL), também potencialmente produtora de OTA, é procedente do Laboratório de Biologia Molecular da UEL (Universidade Estadual de Londrina). Leveduras e fungos foram acondicionados a 4°C.

2.2 FERMENTAÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITO

Cinco mililitros de uma suspensão de 1×10^6 células/mL de levedura foram incubados em meio YPD (Yeast Extract Broth) (20g/L dextrose, 20g/L peptona e 10g/L extrato de levedura, pH 4) por 14 dias a 28°C e 70 rpm. Ao término do período, o fermentado foi filtrado e o mesmo volume de acetato de etila foi adicionado. Esta solução ficou sob constante agitação por 3 horas e foi transferida a um funil de separação. A fase orgânica foi coletada e um novo volume de acetato de etila foi adicionado, sendo o processo repetido duas vezes. Em seguida o extrato foi concentrado por evaporação (KUMAR; GOUSIA; LATHA, 2015).

2.3 TESTE DE DISCO DIFUSÃO

A seleção do extrato de levedura com maior potencial inibitório contra *A. ochraceus* e *A. carbonarius* foi realizada pelo teste de disco difusão. Cem microlitros de uma suspensão de *A. ochraceus* ou *A. carbonarius* (1×10^6 esporos/mL) foram distribuídos em uma placa de Petri contendo ágar SB (*Sabouraud*) (40 g/L dextrose, 10 g/L de peptona e 15 g/L de ágar), um disco de papel filtro de 6mm contendo 20 µL do extrato de levedura ressuspenso com etanol foi adicionado e como controle negativo, discos de papel contendo apenas etanol. As placas foram incubadas a 28°C durante 7 dias (CLSI, 2015).

2.4 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO

Foi avaliada a presença de alcalóides, cumarinas, esteróides e triterpenos, flavonóides e taninos no extrato. Em placa de sílica de cromatografia em camada delgada, o extrato concentrado foi aplicado, seco e colocado em um recipiente

contendo uma fase móvel específica (clorofórmio e metanol para alcalóides; diclorometano e acetona para cumarinas; tolueno e acetato de etila para esteróides e triterpenos; acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água destilada para flavonóides e para taninos). Após a eluição completa da fase móvel, a placa foi seca e reveladores foram aplicados para a detecção dos metabólitos secundários (dragendorff para alcaloides; hidróxido de potássio para cumarinas; vanilina sulfúrica para esteróides e triterpenos; NEU para flavonóides; cloreto férrico para taninos). A revelação dos compostos foi realizada por visualização sob luz UV e/ou por aquecimento (OLIVEIRA, 2016).

2.5 SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO

O extrato seco foi ressuspensionado em acetato de etila e adicionado a uma coluna contendo sílica gel eluída com um gradiente de hexano:acetato de etila, partindo de 100% de acetato de etila até 100% de hexano. As frações foram coletadas e aplicadas em um espectrômetro de massa (AQUEVEQUE et al., 2017). As frações e compostos puros foram analisados por cromatografia gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massa (GC / MS), realizada pelo cromatógrafo de gás Shimadzu CG-2010 acoplado ao detector de massas Shimadzu QP2010. O cromatógrafo de massas foi equipado a uma coluna capilar fundida RTX-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm espessura do filme) (Restek Chromatography Products, EUA). O hélio foi utilizado como gás de arraste, com vazão de 1.0 mL min⁻¹. A programação de temperatura foi ajustada para 50–250°C a taxa de 7 °C min⁻¹, aquecida a 250°C e mantida a essa temperatura por 10 min. A temperatura do injetor foi mantida a 250°C.

2.6 IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ANTIFÚNGICA

As frações secas foram ressuspensas em dimetilsulfóxido (DMSO). Cem microlitros da fração foram aplicados em placas de 96 poços contendo 100µL de meio RPMI-1640 contendo 1x10⁴ esporos/mL de *A. ochraceus* ou *A. carbonarius*. A atividade antifúngica foi avaliada pela leitura da absorbância dos fungos em leitor de microplacas (600 nm) após 50 horas de incubação a 35 °C, a porcentagem de inibição foi avaliada em comparação ao controle negativo (NCCLS, 2002).

2.7 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

O extrato foi aplicado em linhagens de célula padrão para avaliar sua toxicidade. As linhas de células humanas de câncer HEPG2 (carcinoma hepatocelular), HRT18 (adenocarcinoma do reto), HeLa (adenocarcinoma do colo do útero) e as células McCoy (hepáticas normais do rato) foram tratadas com o extrato de *H. burtonii* solubilizado em DMSO, e como controle negativo utilizado apenas DMSO, em diferentes concentrações (100-1000 µg/mL), para determinar a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (IC₅₀). As células foram incubadas a 37°C por 48 horas, a viabilidade celular foi avaliada utilizando MTT, e a absorbância foi avaliada em leitor de microplacas a 570 nm (SABRE et al., 2017).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

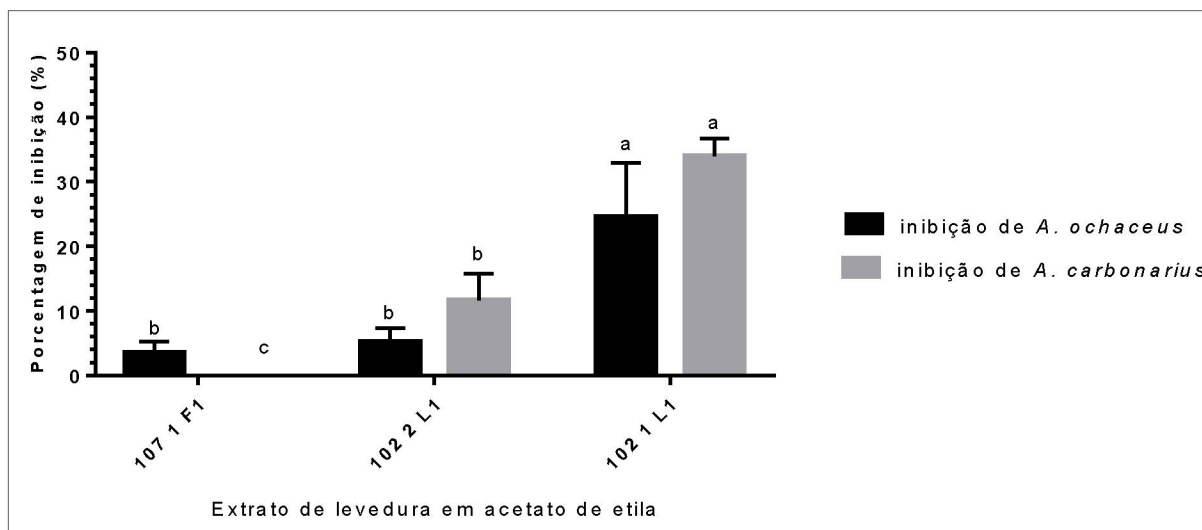
Uma Análise de Variância (ANOVA), foi realizada de acordo com o delineamento inteiramente casualizado para todos os testes de inibição do crescimento das espécies de *Aspergillus*. Quando encontrada significância, foram utilizados os testes de Scott-Knott e teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade, utilizando o software SISVAR 5.6.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TESTE DE DISCO DIFUSÃO

Dentre as leveduras utilizadas, apenas o extrato de 3 apresentaram atividade inibitória e o extrato da levedura *H. burtonii* (102 1 L1) demonstrou a maior atividade inibitória, contra os fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius* (GRÁFICO 3).

GRÁFICO 3 - Porcentagens de inibição de *A. ochraceus* e *A. carbonarius* por extratos de leveduras isoladas de grãos de café



FONTE: O autor (2019)

NOTA: Letras diferentes para cada fungo indicam diferença estatística pelos testes de Skott-Knott e Tukey.

A levedura *H. burtonii* tem atividade inibitória contra vários fungos e tem sido utilizada há muito tempo na fermentação de batata-doce em estado sólido devido à sua capacidade de crescer em condições extremas, como em ambientes com baixa umidade, para enriquecimento de proteínas (YANG et al., 1988). Estudos apontam o potencial inibitório de *H. burtonii* contra fungos produtores de OTA. Virgili et al. (2012) isolaram a levedura da maturação de presunto e testaram sua capacidade inibitória contra *Penicillium nordicum* produtor de OTA e contaminante do presunto, constatando que o fungo foi 88% inibido pela levedura. Não foram encontrados relatos na literatura indicando a eficácia do extrato de acetato de etila de *H. burtonii* contra fungos filamentosos.

3.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO

A partir da determinação dos metabólitos secundários presentes no extrato, foi identificada a presença de esteóroides e triterpenos e compostos fenólicos totais. Ambos os compostos estão relacionados à atividade antimicrobiana e ao potencial antioxidante (NETO et al., 2015).

Compostos fenólicos são indicados como metabólitos bioativos (CHRIST-RIBEIRO et al., 2019), e sua atividade antimicrobiana já foi avaliada, como

demonstrado em estudo de Ng et al. (2019) que os testaram contra *E. coli* e *S. aureus* onde, mesmo na concentração mais baixa usada, obtiveram inibição. Triterpenóides têm propriedades antibióticas, função avaliada por Pagning et al. (2016) utilizando o extrato de *Rhynchospora corymbosa* (L.) Britton, estudo em que encontraram vários metabólitos com essa atividade. Destes, o composto de anel triperpênico inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Esteróides também têm funções antibióticas. Barrett et al. (2018), trabalhando com o complexo esteroide-cobre, descobriram que essa fusão era importante para aumentar a atividade antibacteriana dos compostos contra o *S. aureus*.

3.3 SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO

A composição das frações do metabólito de *H. burtonii* foi analisada em cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (ANEXO 1)

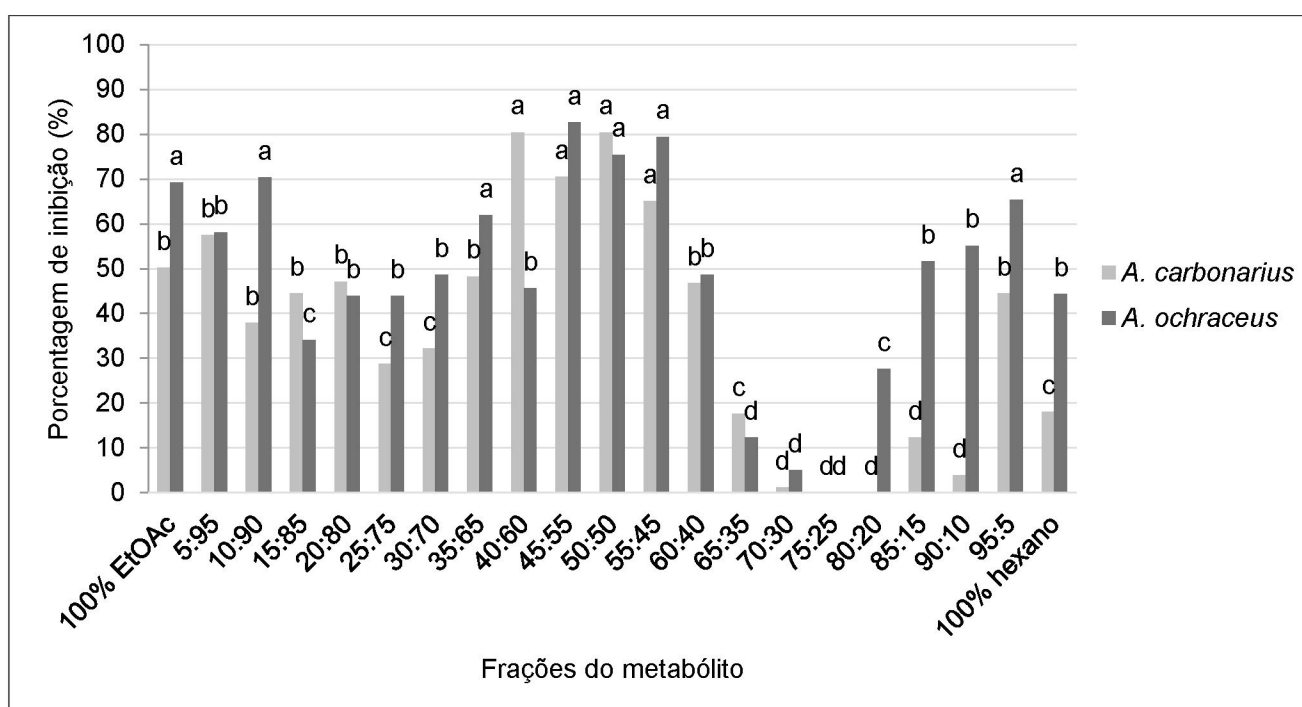
Os compostos identificados apresentam atividade antibiótica, como o ácido butanóico que pode ser utilizado para desinfecção e controle biológico. Pois ele é capaz de inativar as bactérias *Acinetobacter baumannii*, *E. coli* e *Staphylococcus pseudintermedius*, causando danos na membrana das células, atingindo o plasma e acidificando o citosol das bactérias (KENNEDY et al., 2018). Os compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol, que também são produzidos pela *S. cerevisiae*, já foram testados juntos na inibição de *Sclerotinia sclerotiorum* isolado de feijões. Os testes foram realizados *in vitro* e *in vivo*, analisando se os compostos voláteis eram capazes de inibir o fungo em feijões contaminados. Estes compostos inibiram o fungo em placas de Petri dividida, sem o contato direto com a colônia. Na inibição do fungo em grãos de feijão, observou-se uma inibição de 30%. Os mecanismos de ação dos compostos feniletanol, ácido butírico, compostos 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol se devem possivelmente a danos na membrana das células, alterando a sua permeabilidade, reduzindo a atividade de enzimas associadas à membrana e prejudicando a absorção de nutrientes (FIALHO et al., 2011; KENNEDY et al., 2018). O feniletanol age inibindo a produção de aflatoxina em *A. flavus*, sendo que esta inibição se dá ao fato de que o composto age reduzindo a transcrição dos genes ligados à produção desta toxina (HUA et al., 2014).

3.4 IDENTIFICAÇÃO DA FRAÇÃO ANTIFÚNGICA

Frações com as maiores proporções de acetato de etila em geral apresentaram as maiores inibições. Dentre as frações testadas, as que continham maior concentração de acetato de etila foram estatisticamente superiores na inibição de *A. ochraceus* e *A. carbonarius* (

GRÁFICO 4).

GRÁFICO 4 - Porcentagem de inibição de *A. ochraceus* e *A. carbonarius* por metabólitos de *H. burtonii*



FONTE: A autora (2019).

NOTA: Médias seguidas de mesma letra, para o mesmo fungo, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 1%

A partir da identificação dos compostos presentes nas frações, encontrou-se um composto em comum entre todas as frações com maiores capacidades inibitórias, o Feniletanol, substância produzida por diversas plantas e leveduras, como *S. cerevisiae* e *S. uvarum* (LORENZI et al., 2019). Autores trabalharam com os compostos formados na fermentação de cidra, e analisando por CG/MS foi identificado o 2-feniletanol, produzido em grande quantidade pelas leveduras, um dos principais álcoois produzidos pela levedura *S. cerevisiae* durante a fermentação de cidra

(LORENZI et al., 2019). O feniletanol também está relacionado com *quorum sensing* (habilidade de regular seu ciclo de vida em resposta ao ambiente, se organizando estruturalmente e funcionalmente com outros microrganismos presentes) induzindo a formação de biofilme (CHRISTIWARDANA et al., 2019). Ele é um composto quiral, comum em produtos naturais, responsável pelo aroma, sendo importante em alimentos e cosméticos (ZHOU et al., 2019).

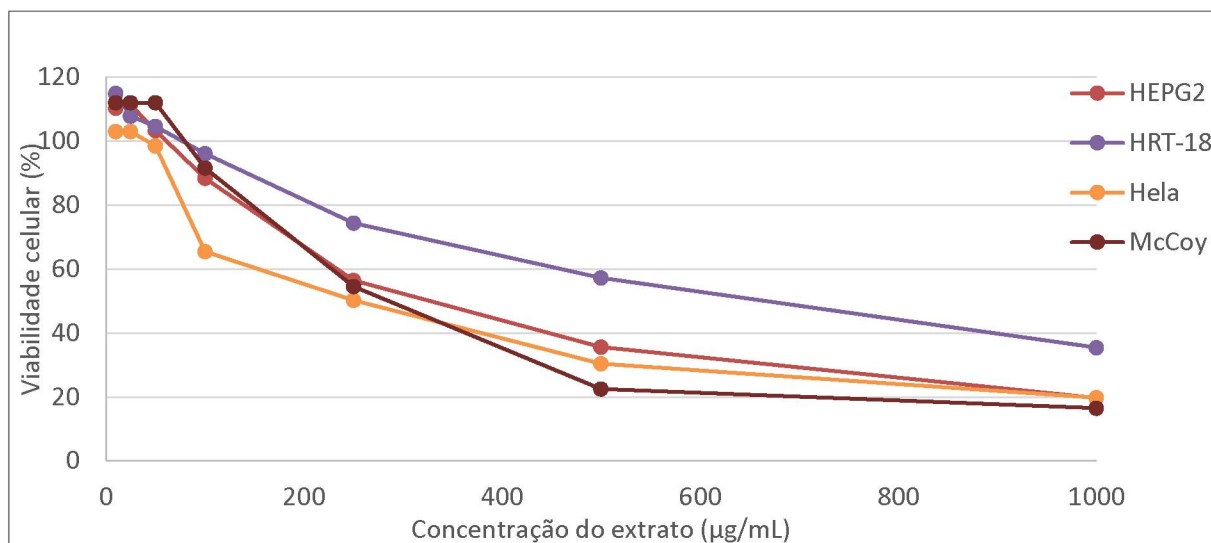
A atividade antifúngica do feniletanol foi avaliada por Hua et al. (2014), onde encontraram que este composto produzido por *P. anomala* é capaz de inibir a germinação do esporo de *A. flavus* e reduzir em até 96% a produção da aflatoxina. Ainda, Liu et al. (2014) demonstraram que este composto produzido pela levedura *K. apiculata* tem seu mecanismo de ação sobre a regulação de genes envolvidos na regulação de autofagia, metabolismo de ácidos graxos, inibição de ribossomo, DNA replicação no fungo *P. italicum*.

Esses resultados indicam que este composto feniletanol apresenta diversas funções, podendo ser utilizado na aplicação em grãos de café para a inibição de espécies de *Aspergillus*.

3.6 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE

Foi testado o efeito do extrato de *H. burtonii* em linhagens de células de câncer (HPEG2, HRT18, HeLa) e células normais de ratos (McCoy) (GRÁFICO 5). Foi determinado o IC₅₀ de HPEG2, Hela e McCoy sendo em torno de 300µg/mL, e nesta concentração foram obtidos 75% de viabilidade celular na linhagem HRT18 (IC₅₀ = 1000 µg/mL). Autores indicam que uma concentração de 75µg/mL de metabólito de leveduras é capaz de gerar o IC₅₀ em células de câncer de colo retal humano (HT-29 e Caco-2) (SABER et al., 2017). Christ-Ribeiro et al. (2019) testaram a atividade citotóxica de compostos fenólicos produzidos a partir da fermentação do farelo de arroz, constatando que as concentrações utilizadas (50, 150 e 250 µg/mL) não foram capazes de causar morte celular quando comparadas ao controle. Foi concluído que eles apresentam baixa citotoxicidade nas linhagens celulares testadas. Nossos resultados mostraram que é necessária uma alta concentração de metabólitos para gerar um impacto antiproliferativo, indicando possível segurança no uso em grãos de café.

GRÁFICO 5 - Viabilidade celular das linhagens HPEG2, HRT18, HeLa e McCoy contra extrato de *H. burtonii*



FONTE: A autora (2019)

4 CONCLUSÃO

A levedura *H. burtonii* (102 1 L1) apresenta potencial para a produção de metabólitos secundários capazes de inibir os fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius*, e que não geram toxicidade às células testadas. Estes resultados são promissores e indicam que a utilização de produtos gerados por leveduras podem ser uma alternativa ao uso de produtos químicos na inibição de fungos produtores de OTA.

REFERÊNCIAS

- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 1078-1099, 2010
- AQUEVEQUE, P.; CÉSPEDES, C.L.; BECERRA, J.; ARANDA, M.; STERNER, O. Antifungal activities of secundar metabolites isolated from liquid fermentations of *Stereum hirsutum* (Sh 134-11) against *Botrytis cinerea* (grey mold agent). **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1048-1054, 2017
- BARRETT, S.; DELANEY, S.; KAVANAGH, K.; MONTAGNER, D. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of novel Cu(II)-steroid complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 479, p. 21-25, 2018.
- CHRIST-RIBEIRO, A.; GRAÇA, C.S.; KUPSKI, I.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L.A. Cytotoxicity, antifungal and anti mycotoxins effects of phenolic compounds from fermented rice bran and *Spirulina* sp. **Process Biochemistry** in press, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.007> 2019
- CHRISTWARDANA, M.; FRATTINI, D.; DUARTE, K.K.D.Z.; ACCARDO, G.; KWON, Y. Carbon felt molecular modification and biofilm augmentation via quorum sensing approach in yeast-based microbial fuel cells. **Applied Energy**, v. 238, p. 239-248, 2019.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI).** M02-A12 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. Twelfth edition. January, 2015
- DURAND, N.; EL SHEIKHA, A. F.; SUAREZ-QUIROS, M.; OSCAR, G.; NGANOU, N. D.; FONTANA-TACHON, A.; MONTET, D. Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. **Food Control**, v. 34, p. 466-471, 2013.
- EFSA (European Food Safety Authority)**, 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal, v. 365, p. 1 - 56, 2006.
- FIALHO, M.B.; MORAES, M.H.D.; TREMOCOLDI, A.R.; PASCHOLATI, S.F. Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 137-142, 2011.
- GALTIER, P.; ALVINERIE, M.; CHARPENTEAU, J.L. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. **Food Cosmetics Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 735-8, 1981.
- HUA, S.S.T; BECK, J.J.; SARREAL, S.B.; GEE, W. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and

expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. **Mycotoxin Research**, v. 30, p. 71-78, 2014.

INTERNATIONAL TRADE CENTER (ITC). The Coffee Exporter's Guide. Terceira edição, Geneva, 2011. Disponível em <<http://www.intracen.org/The-Coffee-Exporters-Guide---Third-Edition/>>. Acessado em 12 de abril de 2018.

KENNEDY, G.M.; MIN, M.Y.; FITZGERALD, J.F.; NGUYEN, M.T.; SCHULTZ, S.L.; CRUM, M.T.; STARKE, J.A.; BUTKUS, M.A.; BOWMAN, D.D.; LABARE, M.P. Inactivation of the bacterial pathogens *Staphylococcus pseudintermedius* and *Acinetobacter baumannii* by butanoic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p.752-73, 2018.

KUMAR, K.A.; GOUSIA, S.K.; LATHA, N.L. Evaluation of biological activity of secondary metabolites of *Neurospora crassa* from Michilipatnam sea water. **Research Journal of Microbiology**, v.10, p. 377-384, 2015.

LASRAM, S.; HAMDI, Z.; CHENENAOU, S.; MLIKI, A.; GHORBEL, A. Comparative study of toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from Barley as affected by temperature, after activity and carbon source. **Journal of Stored Products Research**, v. 69, p. 58-64, 2016.

LIU, P.; CHENG, Y.; YANG, M.; LIU, Y.; CHEN, K.; LONG, C.; DENG, X. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 242-256, 2014.

LORENZINI, M.; SIMONATO, B.; SLAGHENAUFI, D.; UGLIANO, M.; ZAPPAROLI, G. Assessment of yeast for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. **LWT – Food Science and Technology**, v. 99, p. 224-230, 2019.

MAJDINASAB, M.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, P.; LI, P.; ZHANG, Q.; LI, X.; TANG, X. Ultrasensitive and quantitative gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection of ochratoxin A in agro-products. **Journal of Chromatography B**, v. 974, p. 147-1544, 2015.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). M38-A Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação de sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: norma aprovada. V. 22, n. 16, 2002.

NETO, J.P.F; PATRIOTA, B.F.L.; CARDOZO, R.J.M.; SANTANA, E.R.B.; SANTANA, L.H.V. et al. Perfil químico, molecular e antimicrobiano da *Solidago chilensis* Meyen cultivada na Região Metropolitana do Recife-PE. **Revista Arrudea**, v.1, n. 2, 2015

NG, K.R.; LYU, X.; MARK, R.; CHEN, W.N. Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. **Food Chemistry**, v. 270, p. 123-129, 2019

NOBRE, C.; GONÇALVES, D.A.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. One-step co-culture fermentation strategy to produce high-content fructo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 31—38, 2018.

OLIVEIRA, V. B. D. Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico das frondes da espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. (DICKSONIACEAE). 171 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

PAGNING, A.L.N.; TAMOKOU, J.D.; LATEEF, M.; TAPONDJOU, L.A.; KUIATE, J.R.; NGNOKAM, D. New triperne and new flavone glucoside from *Rhynchospora corymbosa* (Cyperaceae) with their antimicrobial, tyrosinase and butyrylcholinesterase inhibitory activities. **Phytochemistry Letters**, v.16, p. 121-128, 2016.

PATERSON, R.R.M; LIMA, N.; TANIWAKI, M.H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, v. 61, p. 1-1, 2014.

PFOHL-LESZKOWICZ A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 465-483, 2009.

RUGGIRELLO, M.; NUCERA, D.; CANNONI, M.; PERIANO, A.; ROSSO, F.; FONTANA, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Antifungal Activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa beans fermentation. **Food Research International**, v.115, p. 519-525, 2019

SABER, A.; ALIPOUR, B.; FAGHFOORI, Z.; KHOSROUSHAHI, A.Y. Secretion metabolites of dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 Isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell line and exhibit anti-pathogenic effects. **Journal of Funcional Foods**, v. 34, p. 408-421, 2017.

TAO, Y.; XIE, S.; XU, F.; LIU, A.; WANG, Y.; CHEN, D.; PAN, Y.; HUANG, L.; PENG, D.; WANG, X.; YUAN, Z. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 320-331, 2018.

VIRGILI, R.; SIMONCINI, N.; TOSCANI, T.; LEGGIERI, M. C.; FORMENTI, S.; BATTILANI, P. Biocontrol of *Penicillium nordicum* Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham. **Toxins**, v. 4, p. 68-82, 2012.

WALKER, G.M.; *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 25–34, 2011.

YANG, S.S. Protein enrichment of sweet potato residue with amylolytic yeasts by solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 886-890, 1988.

ZHOU Y.; PENG, Q.; ZHANG, L.; CHENG, S.; ZENG, L.; DONG, F.; YANG, Z. Characterization of enzymes specifically producing chiral flavor compounds (R)- and (S)-1-phenylethanol from tea (*Camellia sinensis*) flowers. **Food Chemistry**, v. 280, p. 27-33, 2019.

ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125-132, 2015.

DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

O cultivo de café pode sofrer com os efeitos da proliferação de fungos, gerando um produto de baixa qualidade e valor comercial. A principal etapa onde ocorre o crescimento fúngico é na secagem dos grãos, pois esporos encontram-se dispersos na natureza, e durante a secagem as condições climáticas são favoráveis a este crescimento (alta temperatura e umidade). Ainda, se os grãos não passarem por uma secagem correta (umidade relativa de 12%) os fungos irão se proliferar durante o seu armazenamento (onde se encontram em condições climáticas favoráveis), acarretando em perdas ao produtor (EMBRAPA, 2004; TANIWAKI et al., 2014).

No capítulo 2 foi criada uma alternativa para se evitar a proliferação dos fungos *A. ochraceus* e *A. carbonarius* nos grãos de café armazenados - a aplicação de leveduras. O efeito de leveduras isoladas de grãos de café reduz o crescimento fúngico e a produção de ocratoxina A. A atividade de biocontrole de leveduras já é bem conhecida, sendo elas capazes de crescer em diversos produtos alimentícios e de competir com a microbiota presente, gerando frequentemente um efeito benéfico ao produtor (ULLIVARRI; MENDOZA; RAYA, 2018). As leveduras têm a capacidade de crescer em grãos de café, e já são utilizadas hoje no processamento dos grãos, na etapa de fermentação (PEREIRA et al., 2015). Então, utilizá-las diretamente nos grãos de café não iria gerar alterações sensoriais maléficas, já que estas são utilizadas para conferir aroma à bebida (PEREIRA et al., 2015). Essa técnica é útil pois a produção delas em larga escala em biorreatores é viável.

No capítulo 3 foi apresentada outra alternativa à utilização de produtos químicos no controle de fungos em café, pela produção de metabólitos. Os produtos da levedura *H. burtonii* têm a capacidade de inibir fungos do gênero *Aspergillus* e o composto feniletanol é o responsável por esta inibição. Este composto, que já é reconhecido por sua capacidade inibitória em diversos fungos filamentosos, foi apresentado pela primeira vez sendo produzido por *H. burtonii* e utilizado na inibição de espécies de *Aspergillus* (HUA et al. 2014).

Os dados apresentados neste trabalho indicam a aplicação de leveduras e metabólitos produzidos por elas no controle de fungos em processamento de grãos de café, uma hipótese viável de ser utilizada. Como perspectivas, estão mais testes para avaliar a segurança da utilização destes compostos em grãos de café, e a

aplicação do metabólito em grãos de café contaminados. Pelo composto feniletanol ser volátil, novas técnicas podem ser desenvolvidas para se criar uma maneira de utilizar apenas os compostos para entrarem em contato com os fungos.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of Ochratoxin A for Food and Feed Decontamination. **Toxins**, v. 2, p. 1078-1099, 2010.
- AQUEVEQUE, P.; CÉSPEDES, C.L.; BECERRA, J.; ARANDA, M.; STERNER, O. Antifungal activities of secondary metabolites isolated from liquid fermentations of *Stereum hirsutum* (Sh 134-11) against *Botrytis cinerea* (grey mould agent). **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1048-1054, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ (ABIC)**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em: 28 Jul. 2017.
- BARRETT, S.; DELANEY, S.; KAVANAGH, K.; MONTAGNER, D. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity of novel Cu(II)-steroid complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v. 479, p. 21-25, 2018.
- BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PULINA, G. Effects of ochratoxin A on livestock production. **Toxins**, v. 2, p. 1796-1824, 2010.
- CHRIST-RIBEIRO, A.; GRAÇA, C.S.; KUPSKI, I.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L.A. Cytotoxicity, antifungal and anti mycotoxins effects of phenolic compounds from fermented rice bran and *Spirulina* sp. **Process Biochemistry** in press, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.007> 2019
- CHRISTWARDANA, M.; FRATTINI, D.; DUARTE, K.K.D.Z.; ACCARDO, G.; KWON, Y. Carbon felt molecular modification and biofilm augmentation via quorum sensing approach in yeast-based microbial fuel cells. **Applied Energy**, v. 238, p. 239-248, 2019.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)**. M02-A12 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard. Twelfth edition. January, 2015
- COUTO, F. A.; DE SOUZA, S. C.; MONTEIRO, M. C. P.; DA SILVA, D. M.; CIRILLO, M. A.; BATISTA, L. R. Diversity and association of filamentous fungi in coffee beans under organic and conventional cultivation. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 2505-2512, 2014.
- DE BARROS, F. C.; JULIATTI, F. C. Levantamento de fungos em amostras recebidas no laboratório de micologia e proteção de plantas da Universidade Federal de Uberlândia, no período 2001-2008. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 77-86, 2012.
- DE CERAIN, A. L.; GONZALEZ-PENAS, E.; JIMENEZ, A.M.; BELLO, J. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, p. 1058-1064, 2002.
- DE FELICE, D.V.; SOLFRIZZO, M.; DE CURTIS, F.; LIMA, G.; VISCONTI, A.; CASTORIA, R. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine grapes. **Phytopathology**, v. 98, p. 1261-1270, 2008.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.57, p.25-39, 1971.

DRUVEFORS, U.; JONSSON, N.; BOYSEN M.E.; SCHNÜRER, J. Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. **FEMS Yeast Research**, v.2, p. 389-394, 2002.

DRUVEFORS, U.; PASSOTH, V.; SCHNURER, J. Nutrients effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1865-1869, 2005.

DURAND, N.; EL SHEIKHA, A. F.; SUAREZ-QUIROS, M.; OSCAR, G.; NGANOU, N. D.; FONTANA-TACHON, A.; MONTET, D. Application of PCR-DGGE to the study of dynamics and biodiversity of yeasts and potentially OTA producing fungi during coffee processing. **Food Control**, v. 34, p. 466-471, 2013.

EDGINTON, L.V.; KNEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 62, p. 42-44, 1971.

EFSA (European Food Safety Authority), 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. The EFSA Journal, v. 365, p. 1 - 56, 2006.

EMBRAPA. Sobre o Tema. Controle Biológico. Brasília, 2019 em: <<https://www.embrapa.br/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>>. Acesso: 5 mar. 2019.

FARBO, M.G.; URGEGHE, P.P.; FIORI, S.; MARCELLO, A.; OGGIANO, S.; BALMAS, V.; HASSAN, Z.U.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin a-producing *aspergillus carbonarius* and *a. ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.284, p. 1-10, 2018.

FIALHO, M.B.; MORAES, M.H.D.; TREMOCOLDI, A.R.; PASCHOLATI, S.F. Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 137-142, 2011.

FIORI, S.; URGEGHE, P.P.; HAMMAMI, W.; RAZZU, S.; JAOUA, S.; MIGHELI, Q. Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. **International Journl of Food Microbiology**, v. 189, p. 45-50, 2014.

FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.; BOYSEN, M.E.; LINGSTEN, K.J.; SCHNURER, J. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 395-402, 2002.

GALTIER, P.; ALVINERIE, M.; CHARPENTEAU, J.L. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. **Food Cosmetics Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 735-8, 1981.

HABIBA, NOREEN, R.; ALI, S.A.; HASAN, K.A.; SULTANA, V.; ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Evaluation of biocontrol potencial of epiphytic yeast against postharvest *Penicillium digitatum* rot of stored Kinnow fruit (*Citrus reticulata*) and their effect on its physiochemical properties. **Postharvest Biology and Technology**, v.1448, p. 38-48, 2019.

HUA, S.S.T.; BECK, J.J.; SARREAL, S.B.L.; GEE, W. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. **Mycotoxin Research**, v. 30, p. 71-78, 2014.

IAMANAKA, B.T.; TEIXEIRA, A.A.; TEIXEIRA, A.R.R.; COPETTI, M.V.; BRAGAGNOLO, N.; TANIWAKI, M.H. The mycobiota of coffee beans and its influence on the coffee beverage. **Food Research International**, v. 62, p. 353-358, 2014.
ICO (International Coffee Organization). (2016). Online reference included in article [Historical Data] URL <http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/2a-exports.pdf>. Accessed 09/12/2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Ochratoxin A. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and micotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon: IARC, v. 56, p. 489-452, 1993.

INTERNATIONAL TRADE CENTER (ITC). The Coffee Exporter's Guide. Terceira edição, Geneva, 2011. Disponível em <<http://www.intracen.org/The-Coffee-Exporters-Guide---Third-Edition/>>. Acessado em 12 de abril de 2018.

KENNEDY, G.M.; MIN, M.Y.; FITZGERALD, J.F.; NGUYEN, M.T.; SCHULTZ, S.L.; CRUM, M.T.; STARKE, J.A.; BUTKUS, M.A.; BOWMAN, D.D.; LABARE, M.P. Inactivation of the bacterial pathogens *Staphylococcus pseudintermedius* and *Acinetobacter baumannii* by butanoic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p.752-73, 2018.

KHOURY A. E.; ATOUI, A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 4, p. 461–493, 2010.

KUMAR, K.A.; GOUSIA, S.K.; LATHA, N.L. Evaluation of biological activity of secondary metabolites of *Neurospora crassa* from Michilipatnam sea water. **Research Journal of Microbiology**, v.10, p. 377-384, 2015.

LASRAM, S.; HAMDI, Z.; CHENENAOU, S.; MLIKI, A.; GHORBEL, A. Comparative study of toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from Barley as affected by temperature, after activity and carbon source. **Journal of Stored Products Research**, v. 69, p. 58-64, 2016.

LIU, P.; CHENG, Y.; YANG, M.; LIU, Y.; CHEN, K.; LONG, C.; DENG, X. Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 242-256, 2014.

LIU, S.Q.; TSAO, M. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. **Food Control**, v. 20, p. 852-855, 2009.

LORENZINI, M.; SIMONATO, B.; SLAGHENAUFI, D.; UGLIANO, M.; ZAPPAROLI, G. Assessment of yeast for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. **LWT – Food Science and Technology**, v. 99, p. 224-230, 2019.

MAGLIANI, W.; CONTI, S. GERLONI, M.; BERTOLOTTI, D.; POLONELLI, L. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 369-400, 1997.

MAHUNU, G.K.; ZHANG, H.; YANG, Q.; ZHANG, X.; LI, D.; ZHOU, Y. Improving the biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* with phytic acid against postharvest blue mold and natural decay in apples. **Biological Control**, v. 92, p. 172-180, 2016.

MAJDINASAB, M.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, P.; LI, P.; ZHANG, Q.; LI, X.; TANG, X. Ultrasensitive and quantitative gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection of ochratoxin A in agro-products. **Journal of Chromatography B**, v. 974, p. 147-1544, 2015.

MANUAL DE SEGURANÇA E QUALIDADE PARA A CULTURA DO CAFÉ. Projeto PAS Campo, Convênio CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 83 p. (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos).

MASOUD, W.; KALTOFT, C.H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 229–234, 2006.

MASOUD, W.; POLL, L.; JAKOBSEN, M. Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **Yeast**, v. 22, p. 1133-1142, 2005.

MEDINA-CÓRDOVA, N.; ROSALES-MENDOZA, S.; HERNÁNDEZ-MONTIEL, L. G.; ÂNGULO, C. The potencial use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. **Biological Control**, v. 121, p. 216-222, 2018.

MITCHELL, D.; PARRA, R.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 439–445, 2004.

NAEBPOOR, F.; MOMENI, M.; DEHKORDI, F. S. Incidence of ochratoxin A in raw and salted dried fruits using high performance liquid chromatography. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 01-06, 2013.

NALLY, M.C.; PESCE, V.M.; MATURANO, Y.P.; RODRIGUES ASSAF, L.A.; TORO, M.E.; CASTELLANOS DE FIGUEROA, L.I.; VAZQUEZ, F. Antifungal modes of action

of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 91-100, 2015.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). M38-A Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação de sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: norma aprovada. V. 22, n. 16, 2002.

NAYAK, S.; HARSHITHA, M. J.; SAMPATH, C.; ANILKUMAR, H. S.; RAO, C. V. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 86-91, 2013.

NETO, J.P.F; PATRIOTA, B.F.L.; CARDOZO, R.J.M.; SANTANA, E.R.B.; SANTANA, L.H.V. et al. Perfil químico, molecular e antimicrobiano da *Solidago chilensis* Meyen cultivada na Região Metropolitana do Recife-PE. **Revista Arrudea**, v.1, n. 2, 2015

NG, K.R.; LYU, X.; MARK, R.; CHEN, W.N. Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. **Food Chemistry**, v. 270, p. 123-129, 2019

NGANOU, N. D.; DURAND, N.; TATSADJIEU, N. L.; MÉTAYER, I.; MONTET, D.; MBOFUNG, C. M. F. Fungal flora and ochratoxin A associated with coffee in Cameroon. **Science Domain International Journal**, SDI Paper Template Version 1.6, 2012.

NOBRE, C.; GONÇALVES, D.A.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. One-step co-culture fermentation strategy to produce high-content fructo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 31—38, 2018.

OLIVEIRA, V. B. D. Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico das frondes da espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. (DICKSONIACEAE). 171 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

PAGNING, A.L.N.; TAMOKOU, J.D.; LATEEF, M.; TAPONDJOU, L.A.; KUIATE, J.R.; NGNOKAM, D. New triperne and new flavone glucoside from *Rhynchospora corymbosa* (Cyperaceae) with their antimicrobial, tyrosinase and butyrylcholinesterase inhibitory activities. **Phytochemistry Letters**, v.16, p. 121-128, 2016.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G. Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against grays, green and blue postharvest decays. **Food Microbiology**, v. 63, p. 191-198, 2017.

PASTER, N.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; MENASHEROV, M.; NITZAN, R.; WILSON, C.L. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. **Microbiology Research**, v. 97, p. 1201-1206, 1993.

PATERSON, R.R.M; LIMA, N.; TANIWAKI, M.H. Coffee, mycotoxins and climate change. **Food Research International**, v. 61, p. 1-1, 2014.

PAULUK-CORRÊA, I.; BOZZA DE ALMEIDA, A.; PIMENTEL, I.C. Biocontrol activity of yeast strains isolated from green coffee beans against ochratoxin A-producing *Aspergillus* species. **International Journal of Microbiology Research**, v. 10, p. 1268-1273, 2018.

PEREIRA, G.V.M.; BEUX, M.; PAGNONCELLI, M.G.B.; SOCCOL, V.T.; RODRIGUES, C.; SOCCOL, C.R. Isolation, selection and evaluation of antagonistic yeasts and lactic acid bacteria against ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae* on coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 96-101, 2015.

PFOHL-LESZKOWICZ A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 465-483, 2009.

RAMOS, A.J.; LABERNIA, N.; MARIN, S.; SANCHÍS, V.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 133–140, 1998.

RIBELIN, W.E.; FUKUSHIMA, K.; STILL, P.E. The toxicity of ochratoxin A to ruminants. **Canadian Journal of Criminology - Revue Canadienne de Criminologie**, v. 42, p. 172–176, 1978.

ROHR, M.; OLEINIKOV, K.; JUNG, M.; SANDJO, L.P.; OPATZ, T.; ERKEL, G. Anti-inflammatory tetraquinane diterpenoids from a *Crinipellis* species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 514-522, 2017.

ROMANI, S.; SACCHETTI, G.; CHAVES LOPEZ, C.; PINNAVAIA, G.G.; DALLA ROSA, M. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3616–3619, 2000.

RUGGIRELLO, M.; NUCERA, D.; CANNONI, M.; PERIANO, A.; ROSSO, F.; FONTANA, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Antifungal Activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa beans fermentation. **Food Research International**, v.115, p. 519-525, 2019

SABER, A.; ALIPOUR, B.; FAGHFOORI, Z.; KHOSROUSHAHI, A.Y. Secretion metabolites of dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 Isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell line and exhibit anti-pathogenic effects. **Journal of Funcional Foods**, v. 34, p. 408-421, 2017.

SCHMIDT-HEYDT, M.; STOOL, D.; GEISEN, R. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 407-412, 2013.

SCHUMIDT-HEYDT, M.; BAXTER, E.; GEISEN, R.; MAGAN, N. Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and

otapksPV gene expression by *Penicillium verrucosum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 199, p. 277-283, 2007.

SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENANCIO, A. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 35–39, 2006.

SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 251–260, 2000.

SILVA, C.F.; VILELA, D.M.; CORDEIRO, C.S.; DUARTE, W.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Evaluation of a potential starter culture for enhance quality of coffee fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 235-247, 2013.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, p. 71-78, 2002.

SIMONCINI, N.; PINNA, A.; TOSCANI T.; VIRGILI, R. Effect of added autochthonous yeasts on the volatile compounds of dry-cured hams. **International Journal of Food Microbiology**, v. 212, p.25-33, 2015.

SIVETZ, M. & FOOTE, H.E. (1963). *Coffee Processing Technology*. Pp. 48-99. Connecticut, USA: The Avi Publishing Company

SPADARO, D.; DROBY, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, v.47, p.39-49, 2016.

SUÁREZ-QUIROZ, M.; GONZÁLEZ-RIOS, O.; BAREL, M.; GUYOT, B.; SCHORR-GALINDO, S.; GUIRAUD, J. Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 501-507, 2004.

SUBRAMANIAM, R.; RAMPITSCH, C. Towards systems biology of mycotoxin regulation. **Toxins**, v. 5, p. 675-682, 2013.

TAFURI, A.; FERRACANE, R.; RITIENI, A. Ochratoxin A in Italian marketed cocoa products. **Food Chemistry**, v. 88, p. 487–494, 2004.

TANIWAKI, M.H.; TEIXEIRA, A.A.; TEIXEIRA, A.R.R.; COPETTI, M.V.; IAMANAKA, B.T. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. **Food Research International**, v. 61, p. 161–166, 2014.

TAO, Y.; XIE, S.; XU, F.; LIU, A.; WANG, Y.; CHEN, D.; PAN, Y.; HUANG, L.; PENG, D.; WANG, X.; YUAN, Z. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 320-331, 2018.

VIRGILI, R.; SIMONCINI, N.; TOSCANI, T.; LEGGIERI, M. C.; FORMENTI, S.; BATTILANI, P. Biocontrol of *Penicillium nordicum* Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham. **Toxins**, v. 4, p. 68-82, 2012.

WALKER, G.M.; *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 1, p. 25–34, 2011.

YANG, S.S. Protein enrichment of sweet potato residue with amylolytic yeasts by solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 886-890, 1988.

ZHOU Y.; PENG, Q.; ZHANG, L.; CHENG, S.; ZENG, L.; DONG, F.; YANG, Z. Characterization of enzymes specifically producing chiral flavor compounds (R)- and (S)-1-phenylethanol from tea (*Camellia sinensis*) flowers. **Food Chemistry**, v. 280, p. 27-33, 2019.

ZHU, C.; SHI, J.; JIANG, C.; LIU, Y. Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. **Food Control**, v. 50, p. 125–132, 2015.

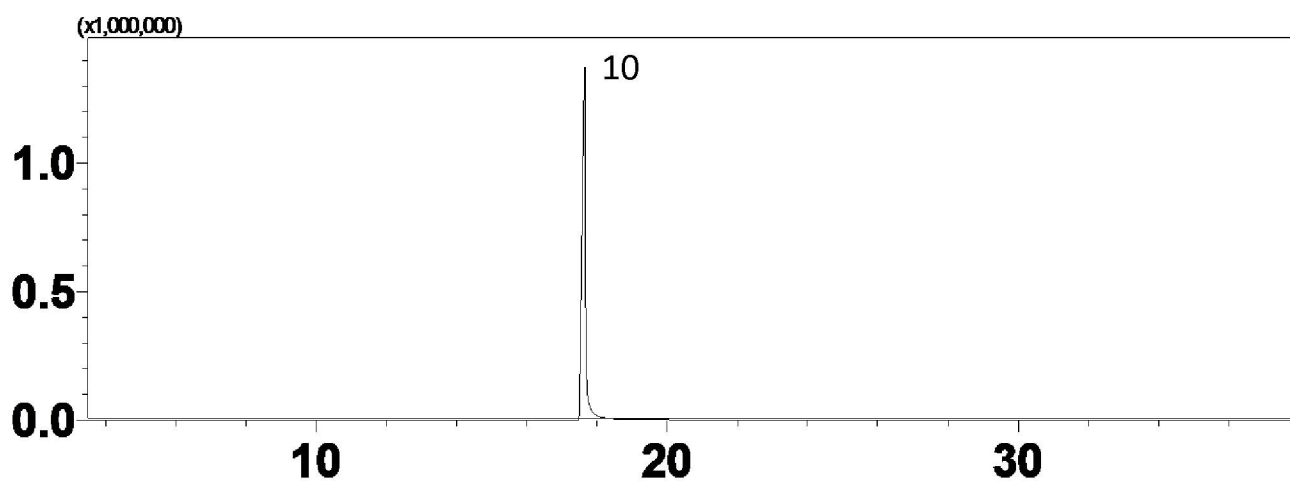
ANEXO I

Cromatogramas das substâncias identificadas

fração 20% acetato de etila / 80% hexano

fração 30% acetato de etila / 70% hexano

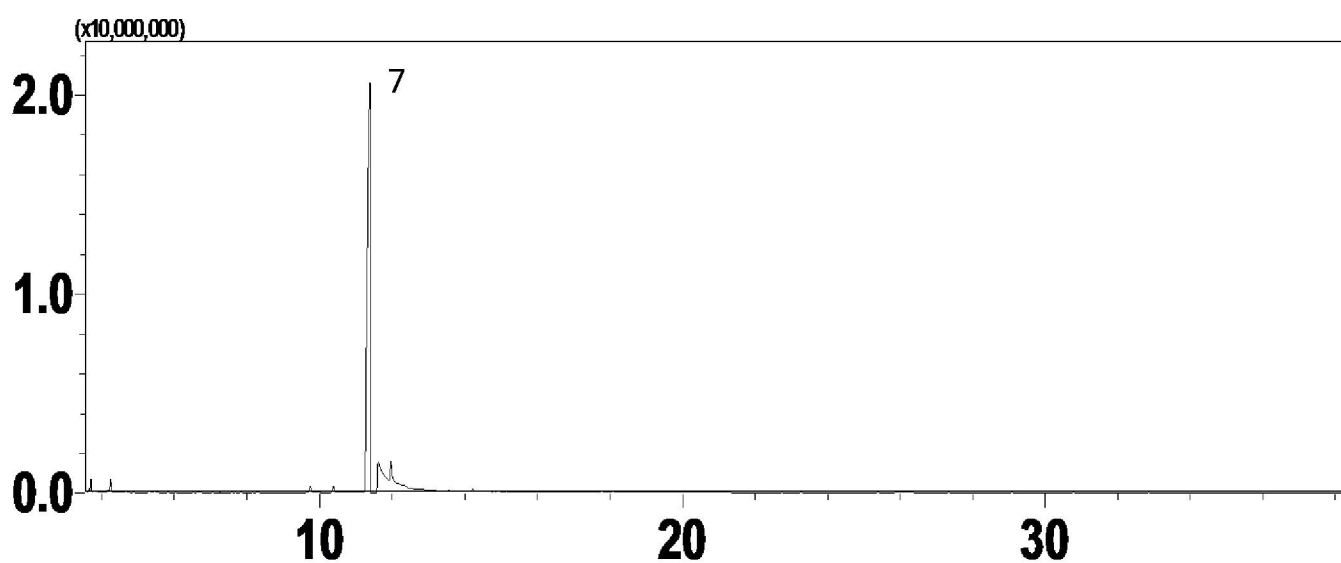
fração 40% acetato de etila / 60% hexano



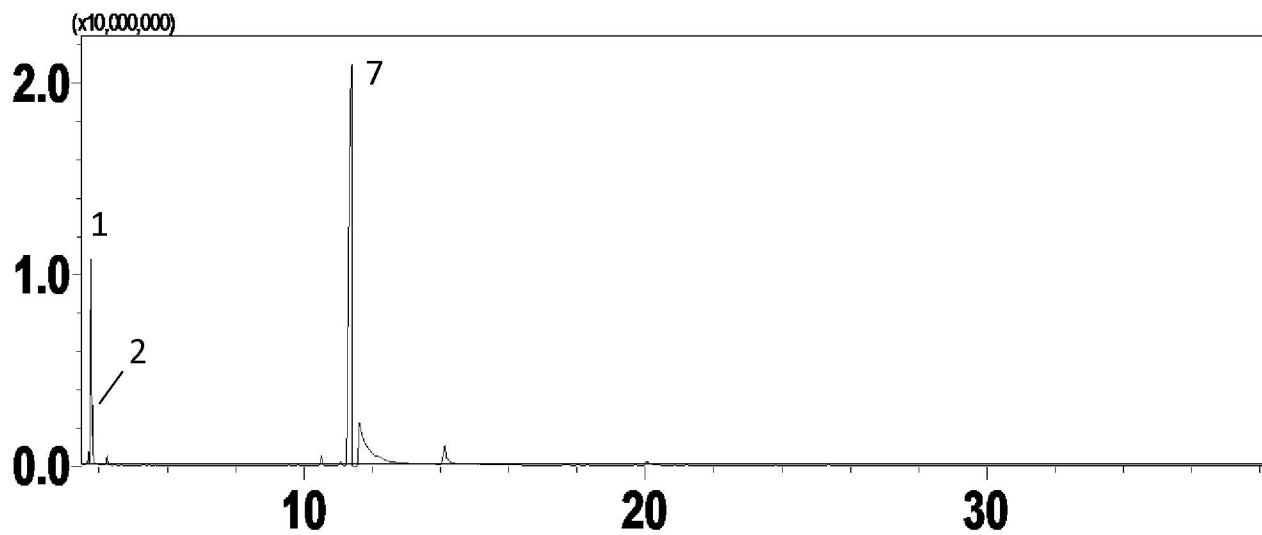
fração 45% acetato de etila / 55% hexano

fração 50% acetato de etila / 50% hexano

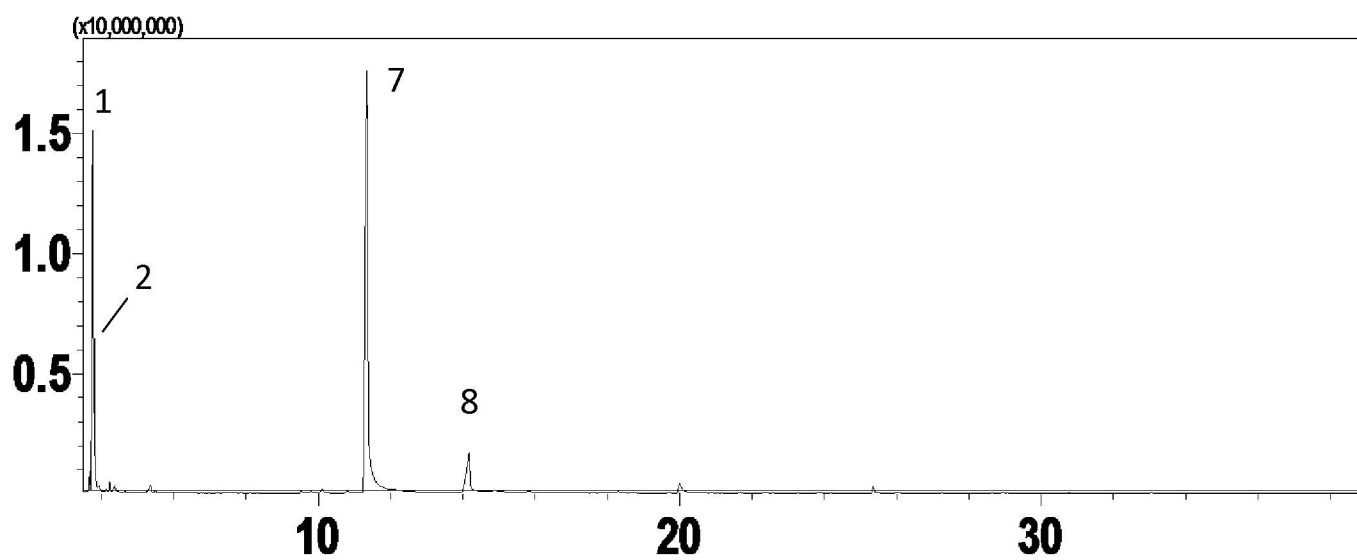
fração 55% acetato de etila / 45% hexano



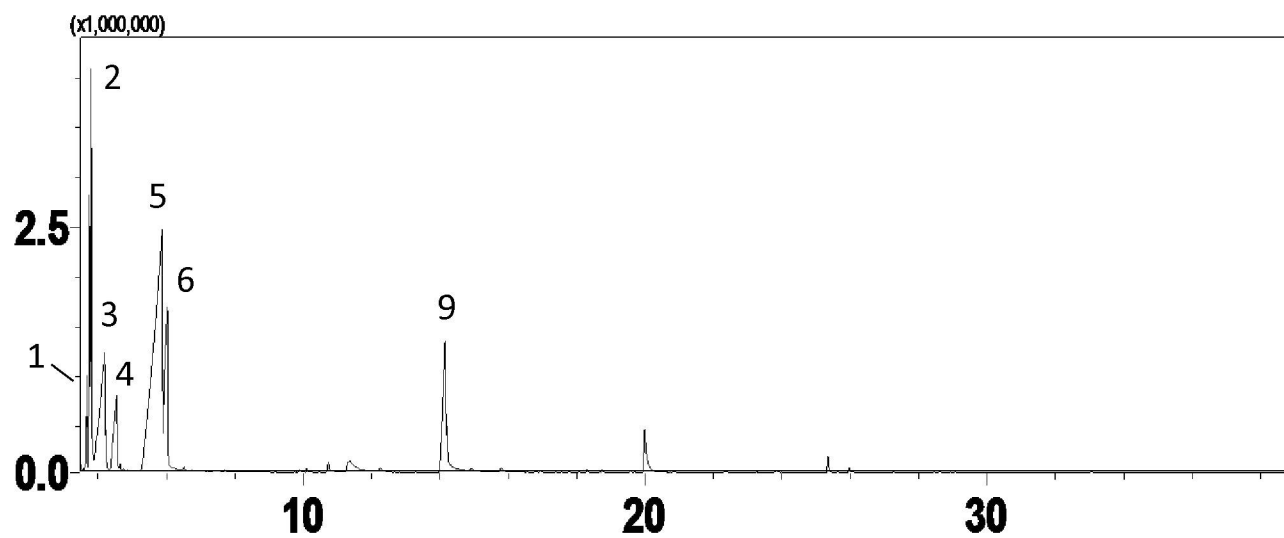
fração 40% acetato de etila / 60% hexano



fração 35% acetato de etila / 65% hexano

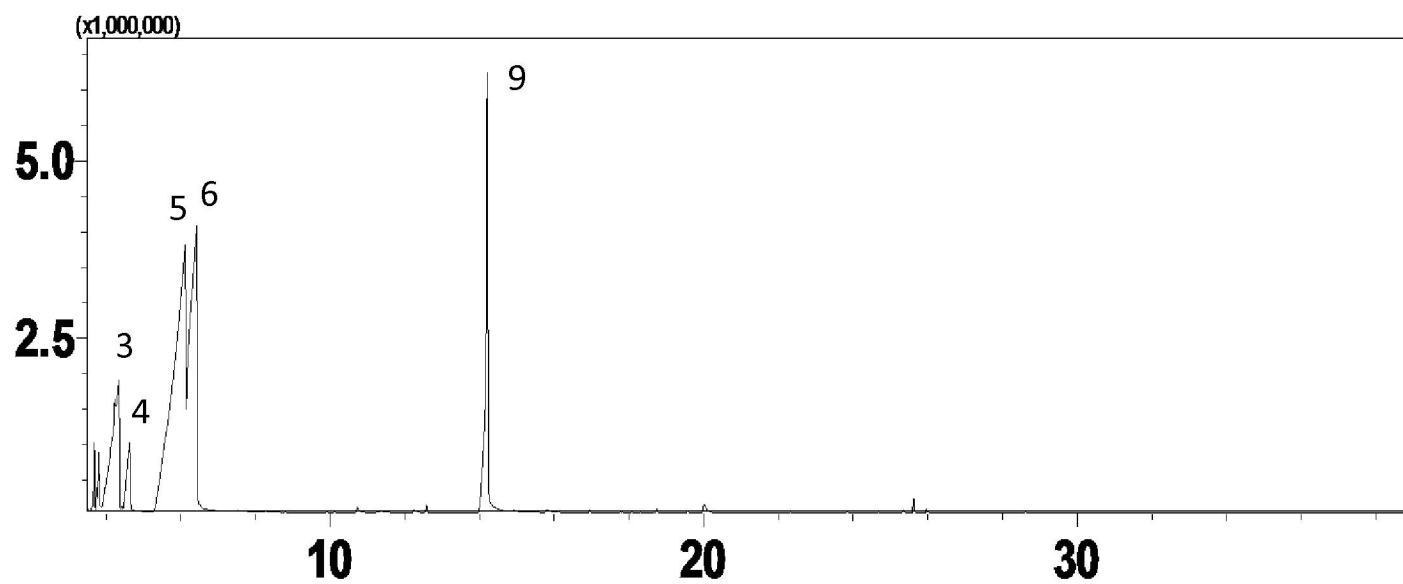


fração 30% acetato de etila / 70% hexano



fração 25% acetato de etila / 75% hexano

fração 20% acetato de etila / 80% hexano



fração 15% acetato de etila / 85% hexano

fração 10% acetato de etila / 90% hexano

fração 5% acetato de etila / 95% hexano

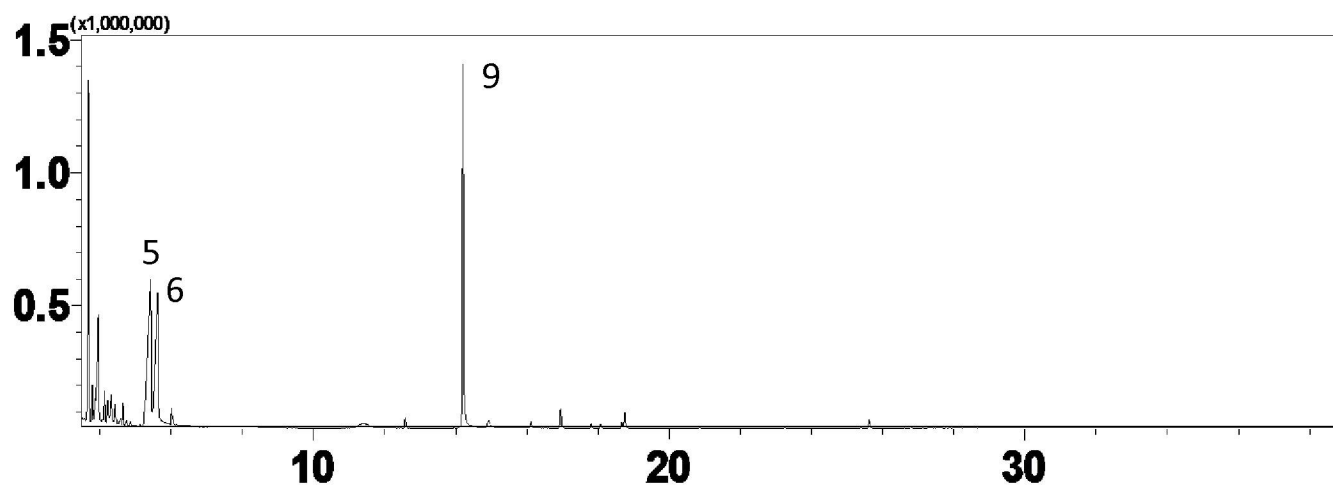
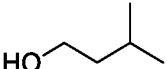
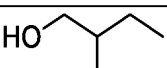
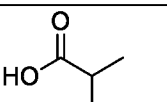
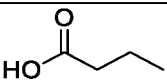
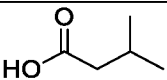
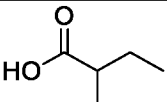
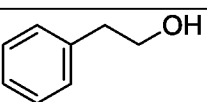
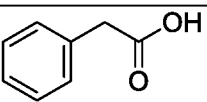
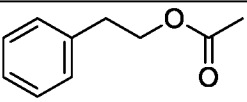
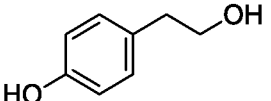


TABELA - Compostos orgânicos identificados por espectrômetro de massa

	Composto	IRc	IRI	Estrutura
1	3-metil-1-butanol	718	719	
2	2-metil-1-butanol	721	722	
3	2-metil-ácido propanoico	741	741	
4	Ácido butanoico	761	763	
5	3-metil-1-ácido butanoico	830	830	
6	2-metil-1-ácido butanoico	843	844	
7	Feniletanol	1122	1122	
8	2-ácido fenilacético	1258	1257	
9	2-acetato feniletanol	1261	1265	
10	4-(2-hidróxietil)fenol	1441	1445	

FONTE: A AUTORA (2019)